

**Agresividad, producción de micotoxinas y diversidad en las poblaciones de *Fusarium graminearum* de la región triguera argentina**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,  
Área Ciencias Agropecuarias*

**Ismael Malbrán**

Ingeniero Agrónomo - Universidad Nacional de La Plata- 2006

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de Fitopatología,  
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano  
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires





## COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

**Gladys A. Lori**

Ing. Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)

Co-director

**Pedro A. Balatti**

Ing. Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)

Ph.D. Plant Pathology (University of Missouri)

Consejero de Estudios

**Ana M. Romero**

Ing. Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Ph.D. Plant Pathology (North Carolina State University)

## JURADO DE TESIS

Director de tesis

**Gladys A. Lori**

Ing. Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

**Erlei Melo Reis**

Engenheiro Agrônomo (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

M.Sc. Fitopatologia (Universidade de São Paulo)

Ph.D. Plant Pathology (Washington State University)

JURADO

**María Rosa Simón**

Ing. Agrónomo (Universidad Nacional de La Plata)

M.Sc. Crop Science, specialization Plant Breeding (Wageningen University)

Ph.D. Plant Ecology and Resource Conservation (Wageningen University)

JURADO

**Virginia Elena Fernández Pinto**

Lic. Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Dra. Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 11 de MARZO de 2013



## AGRADECIMIENTOS

*A mis directores de tesis, Gladys Lori y Pedro Balatti, por abrirme las puertas de su grupo de trabajo y, fundamentalmente, por ser un modelo y un ejemplo a seguir en mi trabajo presente y futuro. Un agradecimiento muy especial para Gladys Lori por su cariño, su contención, su compromiso con esta tesis y su paciencia.*

*A Ana Romero por su apoyo desinteresado, por sus aportes siempre pertinentes y por la orientación a lo largo de todo el desarrollo de este trabajo.*

*A todos los integrantes del Centro de Investigaciones de Fitopatología y del Instituto de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de La Plata por su amistad, por el afecto y por el apoyo que me brindaron desde el comienzo.*

*A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por financiar mis estudios de posgrado y a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata por el apoyo brindado.*

*A mi familia toda y muy especialmente a mis padres y hermanos porque sin su guía, su esfuerzo y su apoyo nada de esto hubiese sido posible.*

*A la familia Lio por estar siempre presente y por el apoyo durante todos estos años.*

*A Vane por su amor, por su incondicionalidad y por haberme soportado aún en mis momentos más difíciles.*



*Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.*





## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Girotti, J.R., Malbrán, I., Lori, G.A. y Juárez, M.P. 2010. Use of solid phase microextraction coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for screening *Fusarium* spp. based on their volatile sesquiterpenes. *World Mycotoxin Journal* 3: 121-128

Girotti, J.R., Malbrán, I., Lori, G.A., y Juárez, M.P. 2012. Early detection of toxigenic *Fusarium graminearum* in wheat. *World Mycotoxin Journal* 5: 143-152.

Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Aulicino, M.B., Balatti, P.A., y Lori, G.A. 2012. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Protection* 42: 234–243

Malbrán, I. y Lori, G.A. 2013. Capítulo 2: Enfermedades fúngicas de las espigas y semillas. La Fusariosis de la Espiga de Trigo. En Cordo, C. y Sisterna, M. (eds.) *Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina*. En prensa.



## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	i
DECLARACIÓN .....	iii
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS .....	v
INDICE GENERAL .....	vii
INDICE DE TABLAS .....	ix
INDICE DE FIGURAS .....	x
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
 CAPÍTULO I	
Introducción general .....	1
1.1. Producción de trigo en el mundo y en la Argentina .....	3
1.2. La Fusariosis de la Espiga de Trigo .....	4
1.2.1. Ciclo de la enfermedad .....	5
1.2.2. Sintomatología y daños .....	7
1.2.3. Impacto de la Fusariosis de la Espiga en la producción de trigo .....	9
1.2.4. Manejo de la Fusariosis de la Espiga de Trigo .....	11
1.3. Justificación .....	14
Hipótesis .....	15
Objetivos .....	16
 CAPÍTULO II	
Identificación taxonómica y variabilidad genética de aislamientos de <i>F. graminearum</i> de la Provincia de Buenos Aires .....	17
2.1. Introducción .....	19
2.1.1. Breve historia de la taxonomía del género <i>Fusarium</i> .....	19
2.1.2. El complejo de especies de <i>F. graminearum</i> .....	20
2.1.3. Diversidad genética en las poblaciones de <i>Fusarium</i> .....	21
2.1.3.1. Marcadores moleculares .....	21
2.1.3.2. Diversidad genética de las poblaciones de <i>F. graminearum</i> .....	24

2.2. Materiales y métodos .....	25
2.2.1. Obtención, identificación taxonómica y mantenimiento de los aislamientos .....	25
2.2.2. Identificación taxonómica mediante PCR especie-específica .....	26
2.2.3. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>F. graminearum</i> .....	27
2.2.4. Análisis de agrupamientos .....	28
2.2.5. Análisis de la varianza molecular .....	29
2.3. Resultados .....	30
2.3.1. Aislamiento e identificación taxonómica .....	30
2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa con primers inter-simple sequence repeats .....	34
2.4. Discusión .....	37
2.5. Conclusiones .....	40

### CAPÍTULO III

Variabilidad en la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina determinada mediante inoculación puntual de espigas de plantas de trigo cultivadas a campo .....

3.1. Introducción .....	43
3.1.1. Evaluación de la respuesta a la infección por <i>F. graminearum</i> en ensayos de patogenicidad .....	43
3.1.2. Variabilidad en la agresividad de poblaciones de <i>F. graminearum</i> .....	45
3.2. Materiales y métodos .....	47
3.2.1. Producción de inóculo e inoculación .....	47
3.2.2. Evaluación de la agresividad .....	48
3.2.3. Análisis estadístico .....	49
3.3. Resultados .....	50
3.4. Discusión .....	58
3.5. Conclusiones .....	62

### CAPÍTULO IV

Capacidad toxicogénica y producción de tricotecenos *in vivo* e *in vitro* de aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina y su relación con la agresividad .....

4.1. Introducción .....	65
4.1.1. Producción de micotoxinas por especies del género <i>Fusarium</i> .....	65
4.1.2. Producción de micotoxinas por <i>F. graminearum</i> .....	68
4.1.3. Rol de las toxinas en la agresividad de <i>F. graminearum</i> .....	69

4.2. Materiales y métodos.....	70
4.2.1. Análisis de los quimiotipos de <i>F. graminearum</i> .....	70
4.2.2. Producción de deoxinivalenol <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	71
4.2.3. Análisis de la expansión de <i>F. graminearum</i> en el raquis desde el punto de inoculación en la espiga.....	72
4.2.4. Análisis estadístico .....	73
4.3. Resultados .....	73
4.3.1. Análisis de los quimiotipos de <i>F. graminearum</i> .....	73
4.3.2. Selección de aislamientos para el análisis de deoxinivalenol <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> y de la expansión de <i>F. graminearum</i> en la espiga .....	74
4.3.3. Producción de deoxinivalenol <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	75
4.3.4. Análisis de la expansión de <i>F. graminearum</i> en la espiga de trigo desde el punto de inoculación.....	76
4.4. Discusión.....	79
4.5. Conclusiones .....	82
CAPÍTULO V	
Conclusiones generales .....	85
5.1. Contexto de la problemática abordada .....	87
5.2. Variabilidad, agresividad y producción de micotoxinas en las poblaciones de <i>F.</i> <i>graminearum</i> de la Provincia de Buenos Aires.....	87
5.3. Aplicaciones de los resultados obtenidos .....	90
5.4. Nuevos interrogantes surgidos a partir del presente estudio.....	91
BIBLIOGRAFÍA .....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Primers inter-simple sequence repeats (ISSR) utilizados en el presente trabajo.....	27
<b>Tabla 2:</b> Aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> incluidos en el presente trabajo .....	33
<b>Tabla 3:</b> Primers inter-simple sequence repeats (ISSR) polimórficos utilizados en los análisis de variabilidad genética mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	34
<b>Tabla 4:</b> Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 112 aislamientos de <i>Fusarium graminearum</i> a partir de la información obtenida con 4 primers ISSR polimórficos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). .....	37

**Tabla 5:** Estimaciones de los componentes de la varianza y heredabilidades ( $H^2$ ) de la severidad de la fusariosis de la espiga de trigo (FET) a los 21 días post inoculación (dpi), peso de mil granos relativo al control sin inocular (PMG) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) para 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas plantas de trigo en 2 años de ensayos de campo. .... 51

**Tabla 6:** Severidad de los síntomas de la fusariosis de la espiga de trigo (FET) a los 21 días post inoculación (dpi), peso de mil granos relativo al control sin inocular (PMG) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) inducidos por 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de plantas de trigo en 2 años de ensayos de campo. .... 52

**Tabla 7:** Primers utilizados para el análisis de los quimiotipos de 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* de la Provincia de Buenos Aires mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex. .... 70

**Tabla 8:** Resultados de agresividad en ensayos de campo, producción de micotoxinas y expansión de la infección del raquis por *Fusarium graminearum*. Los resultados corresponden a 14 aislamientos del patógeno de la Provincia de Buenos Aires. .... 75

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1:** Ciclo de la Fusariosis de la Espiga de Trigo ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae* Schw. & Petch). Adaptado de Trail (2009). .... 6

**Figura 2:** Espigas de trigo con síntomas necróticos en espiguillas ocasionados por la Fusariosis de la Espiga. .... 8

**Figura 3:** Granos de trigo con daño visible ocasionado por la Fusariosis de la Espiga (granos “atizados”). .... 9

**Figura 4:** Identificación morfofisiológica de aislamientos de *Fusarium graminearum*. (A) coloración de micelio aéreo; (B) coloración en medio de cultivo agar papa glucosado (APG); (C) Producción de esporodoquios y peritecios en medio de cultivo agar hoja de clavel (CLA); (D) tamaño y forma de macroconidios. .... 30

**Figura 5:** Fragmento de 284 pb. perteneciente al acceso AY937106.1 del National Center for Biotechnology Information (NCBI), identificado como un fragmento de secuencia genómica específica de *Gibberella zeae* cepa 02-11. Los primers especie-específicos FG16N F / R se alinearon con una identidad del 99% a la secuencia almacenada de acuerdo con la herramienta de búsqueda de alineamientos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). .... 31

**Figura 6:** Especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers FG16N F / R para la identificación de aislamientos de *Fusarium graminearum*. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1000 pb., la C al control sin ADN, la 1 al control positivo de *Fusarium graminearum* (RBG 2507), las 2 – 5 a los controles negativos de *F. culmorum* (RBG997), *F. crookwellense* (RBG999), *F. pseudogramineum* (RBG5339), y *F. sambucinum* (RBG1413), respectivamente y las 6

– 18 a aislamientos fúngicos provenientes de muestras de trigo de la Provincia de Buenos Aires afectadas por la Fusariosis de la Espiga (FET)..... 31

**Figura 7:** Mapa de la Provincia de Buenos Aires mostrando los sitios de procedencia de los aislamientos de *Fusarium graminearum* incluidos en el presente trabajo ..... 32

**Figura 8:** Ejemplo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers inter-simple sequence repeats (ISSR). La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1000 pb, la C al control sin ADN, las 1 - 12 a aislamientos de *Fusarium graminearum* obtenidos en el presente trabajo, la 16 al control positivo de *F. graminearum* (RBG 2507) y las 13, 14, 15 y 17 a los aislamientos de *F. culmorum* (RBG997), *F. crookwellense* (RBG999), *F. pseudogramineum* (RBG5339), y *F. sambucinum* (RBG1413), respectivamente..... 35

**Figura 9:** Fenograma obtenido a partir de los patrones de bandas generados por 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* con 4 primers inter-simple sequence repeats (ISSR) polimórficos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)..... 36

**Figura 10:** Metodología de inoculación de espigas de trigo en ensayos de campo para evaluar la agresividad de 112 aislamientos de *Fusarium graminearum*. (A) Inoculación puntual de una flor de una espiguilla central marcada con una fibra permanente no tóxica; (B) espigas cubiertas con bolsas de polietileno para mantener la humedad relativa  $\approx 100\%$  durante 48 h y favorecer la infección del patógeno. .... 48

**Figura 11:** Desarrollo de síntomas de la Fusariosis de la Espiga (FET) en las espigas de plantas de trigo inoculadas con 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* de la Provincia de Buenos Aires en dos años de ensayos de campo. (A) espigas inoculadas sintomáticas y asintomáticas; (B) desarrollo de síntomas necróticos en el raquis de espigas sintomáticas; (C) esporodoquios conteniendo macroconidios de *F. graminearum* sobre una espiguilla de trigo con síntomas de FET. .... 51

**Figura 12:** Porcentaje sobre el total de las espigas de plantas de trigo inoculadas con 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* en dos años de ensayos de campo que indujeron síntomas de Fusariosis de la Espiga (FET) por encima y por debajo del punto de inoculación (PI) y síntomas de desecamiento prematuro a los 21 días post inoculación para 3 grupos de agresividad: (A) aislamientos de baja agresividad, (B) aislamientos de agresividad media, y (C) aislamientos de agresividad alta. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del PI y los negativos aquellas ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente) ..... 55

**Figura 13:** Porcentaje de espigas de trigo con síntomas visibles de Fusariosis de la Espiga (FET) por encima y por debajo del punto de inoculación (PI) a los 21 días post inoculación. Valores obtenidos del total de espigas sintomáticas inoculadas con 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* en 2 años de ensayos de campo. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del PI y los negativos las ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ). ..... 56

- Figura 14:** Desarrollo de síntomas de desecamiento prematuro en la porción apical de espigas de plantas de trigo inoculadas con aislamientos de *Fusarium graminearum* procedentes de la Provincia de Buenos Aires en ensayos de campo. .... 56
- Figura 15:** Análisis de regresión de 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de plantas de trigo cultivadas a campo mediante inoculación puntual (PI) entre: (A) la severidad de la infección inducida y el peso de mil granos (PMG) relativo al control sin inocular; (B) la severidad de la infección inducida y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad inducida (ABCPE); y (C) el ABCPE y el PMG. .... 57
- Figura 16:** Estructura de los tricotecnos de los grupos A y B (adaptada de Langseth y Rundberget 1998). .... 67
- Figura 17:** Sembrado en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) de los artejos de la porción apical del raquis de una espiga de trigo inoculada con un aislamiento de *Fusarium graminearum*. .... 72
- Figura 18:** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex para determinación de los quimiotipos de *Fusarium graminearum*. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1000 pb, la C al control sin ADN, la 1 al control positivo de *F. graminearum* de quimiotipo deoxinivalenol (DON), la 2 al control positivo de *F. graminearum* de quimiotipo nivalenol (NIV), las 3 - 10 a aislamientos de *F. graminearum* obtenidos en el presente trabajo, todos ellos de quimiotipo DON. .... 74
- Figura 19:** Análisis de regresión entre la severidad de los síntomas de Fusariosis de la Espiga a los 21 días post inoculación y la concentración de deoxinivalenol (DON) en los granos. Los resultados fueron obtenidos de la inoculación de 14 aislamientos de *Fusarium graminearum* de la Provincia de Buenos Aires en espigas de plantas de trigo en dos años de ensayos de campo. .... 76
- Figura 20:** Vista superior (A) e inferior (B) de un cultivo de artejos de la porción apical del raquis de una espiga de trigo inoculada con un aislamiento de *Fusarium graminearum* en medio de cultivo agar papa glucosado (APG). .... 76
- Figura 21:** Porcentaje de espigas de plantas de trigo inoculadas a campo con 14 aislamientos de *Fusarium graminearum* con síntomas visibles de Fusariosis de la Espiga (FET) y de desecamiento prematuro a los 21 días post inoculación (dpi) y con artejos colonizados. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del punto de inoculación (PI) y los negativos aquellas ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente). .... 77
- Figura 22 -** Porcentaje de espigas de plantas de trigo inoculadas con 14 aislamientos *Fusarium graminearum* con los artejos por encima y por debajo del punto de inoculación (PI) infectados por el patógeno. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del PI y los negativos las ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ). .... 78



## ABREVIATURAS

15-ADON	15-acetil deoxinivalenol
3-ADON	3-acetil deoxinivalenol
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFLP	polimorfismo en el largo de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AMOVA	análisis de la varianza molecular
ANOVA	análisis de la varianza
APG	medio de cultivo agar papa glucosado
ATA	leucopenia tóxica alimentaria (Alimentary Toxic Aleukia)
ABCPE	área bajo la curva de progreso de la enfermedad
CLA	agar clavel (carnation leaf agar)
CR	pudrición de la corona (crown rot)
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetyl trimethyl ammonium bromide (C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> )N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DON	deoxinivalenol
dpi	días post inoculación
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FET	Fusariosis de la Espiga de Trigo
H <sup>2</sup>	heredabilidad en sentido amplio
HR	humedad relativa
ISSR	inter-repeticiones de secuencia simple (Inter-Simple Sequence Repeats)
NIV	nivalenol
PCNB	pentacloronitrobenceno
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PH	peso hectolítrico (g/hL)
PI	punto de inoculación
PMG	peso de mil granos
ppm	partes por millón
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RFLP	polimorfismo en el largo de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphisms)
RNAasa	ribonucleasa
SSR	repeticiones de secuencia simple (Simple Sequence Repeats)
Tris	tris(hidroximetil)aminometano ( $\text{HOCH}_2$ ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>
VCG	grupos de compatibilidad vegetativa (vegetative compatibility groups)
ZEA	zearalenona

## RESUMEN

La “fusariosis de la espiga de trigo” (FET) o “golpe blanco”, ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe, es una enfermedad que afecta al cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) en todo el mundo, incluyendo la Argentina. La enfermedad ocasiona disminuciones del rendimiento, perjuicios sobre la calidad del trigo y la contaminación del grano con micotoxinas, que constituyen un riesgo para la salud y comprometen su utilización en la alimentación. Estos metabolitos, principalmente el deoxinivalenol (DON), han sido indicados como posibles factores de patogenicidad. La principal alternativa para el manejo de la enfermedad la constituye la resistencia genética. El conocimiento de la diversidad a nivel genético de las poblaciones de *F. graminearum* así como de la variabilidad en la agresividad presente en ellas y su relación con la producción de toxinas es información indispensable para la búsqueda de genotipos resistentes a la FET. En el presente trabajo, 112 aislamientos de *F. graminearum* de 28 poblaciones de la Provincia de Buenos Aires fueron analizados en su variabilidad genética, agresividad y capacidad de producción de micotoxinas. Una significativa heterogeneidad genética fue observada en las poblaciones, la mayor parte de la cual correspondió a diferencias dentro de las poblaciones antes que entre las poblaciones. La agresividad de los aislamientos, ensayada mediante la inoculación artificial de espigas de plantas de trigo cultivadas a campo, resultó un rasgo altamente heredable, variable y no estructurado geográficamente. La desecación de la porción superior de las espigas sintomáticas, probablemente debida a deficiencias de agua y nutrientes resultantes de la invasión vascular del patógeno, resultó ser una función de la agresividad de los aislamientos. Todos los aislamientos analizados presentaron quimiotipo genético DON. Se encontró una correlación significativa entre la severidad de los síntomas de la FET y la acumulación de toxina en los granos, pero no entre la producción de DON *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos constituyen un significativo aporte al conocimiento de la dinámica de una enfermedad tan importante para la producción como constituye la FET.

**Palabras clave:** Fusariosis de la Espiga de Trigo; golpe blanco; trigo (*Triticum aestivum* L.); deoxinivalenol.

## ABSTRACT

Fusarium Head Blight (FHB) of wheat, caused by *Fusarium graminearum* Schwabe, is a destructive disease that affects wheat cultivated areas worldwide, including those in Argentina. The disease reduces wheat yield, damages quality and contaminates the resulting grain with mycotoxins, which are a health risk and compromise its use. These metabolites, mainly deoxynivalenol (DON), have been indicated as potential pathogenicity factors. The main alternative for the management of the disease is genetic resistance. The knowledge of genetic diversity of the fungus, as well as variability in aggressiveness and its relationship with toxin production by the populations of *F. graminearum* is essential information in the search for FHB resistant wheat genotypes. In this study, 112 isolates of *F. graminearum* from 28 populations were screened for their genetic variability, aggressiveness and mycotoxin production. A high genetic heterogeneity was observed in the populations, with most of the variability resulting from differences within rather than among populations. Aggressiveness of the isolates, tested by point inoculation of field grown wheat spikes, was a highly heritable trait, which was not geographically structured. The premature ripening of the upper portion of the spike, probably due to water and nutrient deficiencies resulting from vascular invasion by the pathogen, proved to be a function of the aggressiveness of the isolates. All isolates were DON producers according to their genetic chemotype. A significant correlation was found between the symptoms severity and *in vivo* toxin production, but not between *in vitro* and *in vivo* DON production. These results represent a significant contribution to the knowledge of the dynamics of FHB.

**Keywords:** Fusarium Head Blight of Wheat; wheat (*Triticum aestivum* L.); deoxynivalenol.

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



# **CAPÍTULO I**

## **Introducción general**

### **1.1. Producción de trigo en el mundo y en la Argentina**

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es el cereal que dio origen a la civilización occidental con la revolución agrícola ocurrida a principios del Neolítico, aproximadamente 12 mil años a.C. Sus antecesores cultivados, los grupos einkorn (*Triticum monococcum* L.) y emmer (*Triticum dicoccum* Schübl.), fueron domesticados en la región de la “Creciente Fértil” del Cercano Oriente (Norte de Siria e Irak) aproximadamente 7.500 años a.C (Nesbitt 2001). Estos grupos habrían ingresado en Europa por la región de los Balcanes en el año 4 mil a.C., aunque existen evidencias de que especies más evolucionadas estuvieron difundidas desde 6 mil a.C. en la región de Knossos, Isla de Creta (Harlan 1992). Hacia 1493, parte de las semillas de trigo con que la tripulación del segundo viaje de Cristóbal Colón fue provista para la elaboración de galleta marinera llegó al continente americano.

En la Argentina, la historia del cultivo de trigo se encuentra íntimamente ligada a lo que ha sido el propio desarrollo de la República. Según Giménez (1969), el primer antecedente de siembra del cereal en el territorio nacional data de 1527, cuando se sembraron 50 gramos a la vera de las empalizadas del fuerte Sancti Spiritu que construyera Sebastián Gaboto.

En los últimos 50 años del siglo XX, y en gran medida debido a la implementación del Plan para el Desarrollo Agrícola Mundial de la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO), más conocido como “Revolución Verde”, se produjeron importantes avances en el valor de la producción anual de trigo. Gran parte del éxito logrado se debió a la utilización de agroquímicos, fertilizantes y adecuadas prácticas de manejo así como a la utilización de cultivares de alto potencial de rendimiento y amplia adaptación, capaces de responder positivamente a dichas mejoras.

En el país, el cultivo de trigo se realiza fundamentalmente en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, La Pampa y Entre Ríos, y, en menor proporción, en las provincias del Noreste Argentino (NEA) y del Noroeste Argentino (NOA). Debido a la gran extensión del área y a la variabilidad en las condiciones ambientales presentes, la región de cultivo ha sido dividida en siete subregiones agroecológicas, dos de ellas a su vez subdivididas: NOA, NEA, I, II Norte, II Sur, III, IV, V Norte y V Sur.

En la campaña triguera 2010/11 se cosecharon en la Argentina 4,27 millones de hectáreas implantadas con cultivos de trigo, un 67% más que en el ciclo previo. El rendimiento promedio nacional (3,40 ton/ha) constituyó un récord histórico, superando ampliamente el alcanzado en la campaña anterior (2,51 ton/ha). Como resultado, la producción nacional estimada fue de 14,5 millones de toneladas (Mt), un 97% superior a la de la campaña precedente.

Las mejores condiciones para la producción de trigo en la Argentina se encuentran en la provincia de Buenos Aires. En la citada campaña, este distrito aportó el 60% de la

producción nacional (8,7 Mt), seguida por Córdoba (1,8 Mt), Santa Fe (1,7 Mt) y Entre Ríos (1,1 Mt). La provincia abarca dos de las subregiones trigueras (IV y II Sur) y parte de una tercera (V Sur). En la subregión IV, los rendimientos estuvieron entre 4.000 y 7.000 kg/ha, mientras que en la II Sur, éstos superaron todos los registros históricos para este cultivo, obteniéndose en algunos lotes rendimientos superiores a los 8.000 kg/ha. La porción de la región V Sur perteneciente a la provincia de Buenos Aires, por su parte, presentó rindes de hasta 3.300 kg/ha en las zonas serranas de suelos profundos. (Informe institucional sobre la calidad del Trigo Argentino; disponible en <http://www.trigoargentino.com.ar/2011/ESP/index.html>).

A nivel mundial, el cultivo de trigo abarca el 31,8% de la superficie implantada con cereales y el 26,76% de la producción (correspondiente al 6,53% del total de cultivos), así como el 54% del comercio internacional de granos (144 Mt). Según estimaciones de la FAO, en el año 2010 se cosecharon en todo el mundo 216.974.683 has de trigo con rendimientos promedio de cerca de 3 t/ha, siendo la producción total de más de 650 Mt. El ranking de países productores lo encabezó China con más de 115 Mt producidas (aproximadamente el 17% del total). La Argentina, por su parte ocupó la 13ª posición con casi 15 Mt anuales, equivalentes al 2,3% de la producción y el 2% de la superficie cosechada con el cereal en el mundo (fuente: FAOSTAT, - <http://faostat.fao.org/>).

## 1.2. La Fusariosis de la Espiga de Trigo

Entre las enfermedades que afectan al cultivo de trigo, las de origen fúngico son las que prevalecen. Entre ellas se destacan aquellas que afectan al área foliar como las royas (*Puccinia graminis* Pers.:Pers.f. sp. *tritici*, *P. triticina* Eriks. y *P. striiformis* West. f. sp. *tritici*, respectivamente); la mancha amarilla (*Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker) y la septoriosis (*Septoria tritici* Rob.); y aquellas que afectan a la espiga como los carbones (géneros *Tilletia* y *Ustilago*). Dentro de este último grupo se destaca la “fusariosis de la espiga de trigo” (FET) o “golpe blanco”, la cual afecta al cultivo de trigo en todas las áreas del mundo, incluyendo la Argentina (de Galich 1997; Gilbert y Tekauz 2000; Lori *et al.* 2003).

La FET fue descrita por primera vez en Inglaterra en el año 1884 y considerada un grave peligro para los cultivos de trigo y cebada desde los primeros años del siglo XX (Stack 1999). Desde entonces, la historia del estudio de la FET ha enfrentado cambios radicales que permiten dividir su desarrollo en cuatro períodos de tiempo de características muy variables (Stack 2003).

La primera etapa, caracterizada por los primeros reportes de la enfermedad y la identificación de los agentes causales, abarcó desde los comienzos de la patología vegetal en la década de 1880 hasta la primera década del siglo XX. En 1908, cuando se consiguió la reproducción experimental de la enfermedad mediante la inoculación artificial, comienza la segunda etapa, caracterizada por los estudios experimentales sobre la etiología, patogenicidad y susceptibilidad de los hospedantes de la FET. Durante las décadas de 1950 y 1960, la reconfiguración de la taxonomía del género *Fusarium* impulsada por Snyder y Hansen (Snyder y Hansen 1940; 1941; 1945; 1954) dio lugar a la “era oscura” en el estudio de la enfermedad. La simplificación derivada de la reducción de un importante número de especies, entre ellas *F. graminearum*, a un



único organismo (*F. roseum*), dificultó la investigación de la FET y ocasionó que los resultados obtenidos en estos años resultasen difíciles de evaluar e interpretar *a posteriori*. Alrededor de 1980 comienza la era “moderna” del estudio de la FET, caracterizada por el mayor nivel de detalle alcanzado en el estudio de la enfermedad. El resurgimiento de la aproximación a una mayor complejidad en la identificación taxonómica de las especies del género (Nelson *et al.* 1983) junto con la identificación de la capacidad de algunos hongos patógenos de producir micotoxinas y el desarrollo de métodos prácticos para su detección impulsaron el renacimiento del estudio de la FET.

En los casi 130 años transcurridos desde los primeros reportes de la enfermedad, al menos 17 especies dentro del género *Fusarium* han sido asociadas con la ocurrencia de ataques de FET en la mayor parte de las regiones productoras de trigo a nivel mundial (Parry *et al.* 1995). Entre las especies causantes de la FET se destacan *F. graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schw. & Petch<sup>1</sup>), *F. culmorum* (W.G. Smith) Sacc., *F. avenaceum* (Corda : Fr.) Sacc. [*G. avenacea* (Cook)], *F. equiseti* (Cda.) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb, *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. acuminatum* Ellis & Everhart (*G. acuminata* Wollenw.) y *F. crookwellense* Burgess, Nelson & Tousson, entre otras. Asimismo, el hongo *Microdochium nivale* (Fries) Samuels & Hallett [= *F. nivale* (Fr.) Ces.] ha sido citado como causante de la FET en regiones frías.

A pesar del gran número de especies asociadas con la ocurrencia de la enfermedad, tres son las que predominan internacionalmente como agentes causales de la FET: *F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. avenaceum*. La distribución geográfica de estas especies se ha relacionado con sus requerimientos de temperatura: mientras que en las regiones cálidas, incluyendo Estados Unidos (EE.UU.), Canadá, Australia y Europa Central, *F. graminearum* es generalmente considerada la especie prevaleciente, en las regiones más frías, como las marítimas del noroeste de Europa, *F. culmorum* tiende a predominar y *F. poae* y *M. nivale* asumen un rol importante (Parry *et al.* 1995).

En la Argentina, el principal patógeno asociado con la FET es *F. graminearum*. Otras especies menos patogénicas de *Fusarium*, entre las que se encuentran *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. poae*, y *F. acuminatum*, han sido aisladas a partir de granos infectados en campañas en que las condiciones climáticas no han favorecido la presencia del principal agente causal (de Galich 1997).

### 1.2.1. Ciclo de la enfermedad

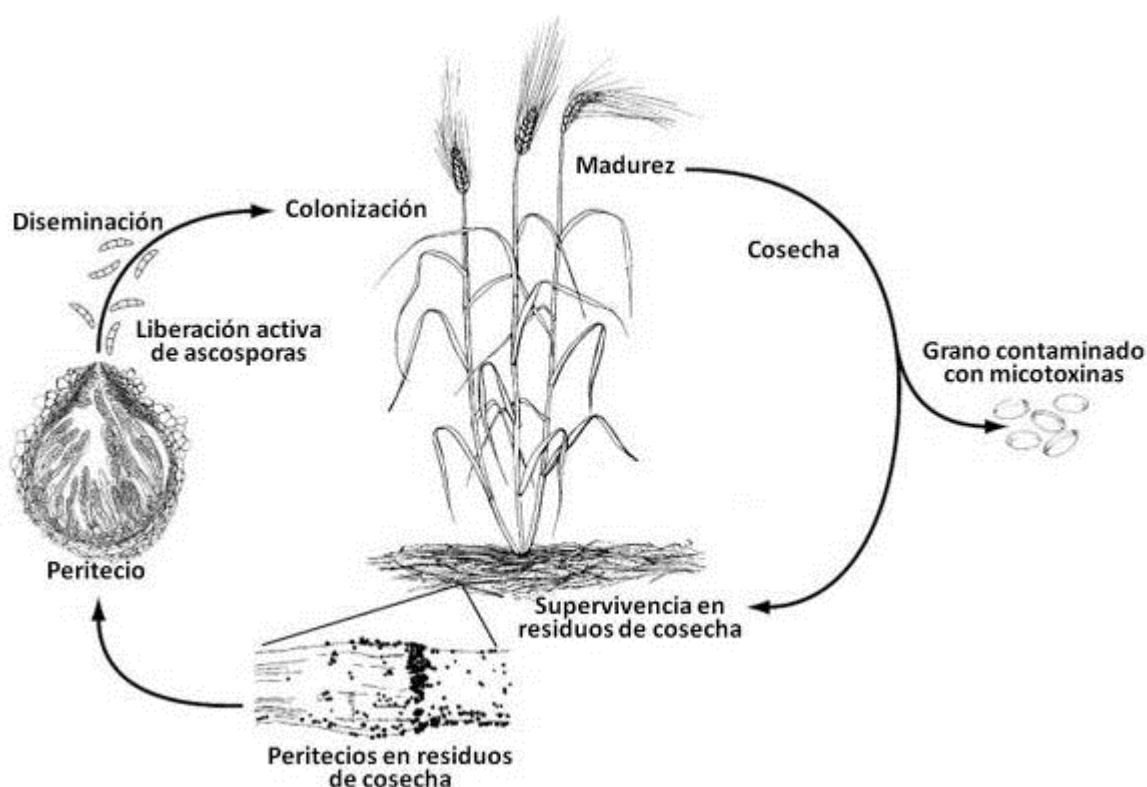
El proceso infectivo de la FET se inicia cuando las ascosporas de *G. zeae* son liberadas en presencia de alta humedad relativa y depositadas por el viento en las anteras expuestas de la espiga del trigo (Figura 1). El inóculo primario para la

<sup>1</sup> En un reciente acuerdo internacional referente a la taxonomía de los hongos, la eliminación del uso de los nombres duales en hongos pleiomórficos ha sido propuesta (Hawksworth 2011). Sin embargo, una fracción considerable de la comunidad micológica se ha mostrado disconforme con esta decisión (Gams y Jaklitsch 2011). Quienes se han mostrado contrarios a la supresión de la doble nomenclatura alegan que ésta ha sido prematura debido a que todavía la mayor parte de los géneros fúngicos permanece sin ser adecuadamente tipificada y requiere de ser revisada contemplando el aspecto molecular y sostienen que la dualidad de nombres no debe ser suprimida hasta tanto los comités responsables no publiquen una decisión respecto del uso preferencial de una u otra denominación (Gams *et al.* 2012).

enfermedad proviene de los residuos de cosecha en los que el patógeno sobrevive en estado sexual. En la primavera, el tiempo cálido y húmedo favorece el desarrollo y maduración de los peritecios que producen ascosporas en forma concurrente con la floración de los cereales.

Las ascosporas son liberadas en forma activa de los peritecios maduros formados en la superficie del rastrojo y son dispersadas por el viento, la lluvia o los insectos hacia los hospedantes (Gordon 1959; Parry *et al.* 1995). La probabilidad de que estas ascosporas infecten la espiga aumenta con la ocurrencia de períodos de 48-60 h de mojado persistente y temperaturas de 20°-30°C en coincidencia con el período crítico o de mayor susceptibilidad del trigo, que se extiende desde el comienzo de la floración (Zadoks 60) hasta el estado de grano pastoso (Zadoks 85) (Zadoks *et al.* 1974; Sutton 1982; Goswami y Kistler 2004).

La ascosporas que se depositan sobre las anteras o que ingresan a la flor por la apertura existente entre las glumelas (lemma y palea) inician el proceso infectivo. El patógeno inicialmente no penetra directamente a través de la epidermis si no que lo hace utilizando las anteras expuestas de la flor, motivo por el cual la susceptibilidad de las espigas a la infección es mayor durante la antesis (Schroeder y Christensen 1963). Una vez que el patógeno se encuentra dentro de la flor, las anteras, estigmas y lodículas son los órganos más fácilmente colonizables (Bushnell *et al.* 2003).



**Figura 1** - Ciclo de la Fusariosis de la Espiga de Trigo ocasionada por *Fusarium graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae* Schw. & Petch). Adaptado de Trail (2009).

En un primer momento, el hongo crece en forma intercelular y asintomática. Luego, desde los espacios intercelulares se dispersa radialmente en forma intracelular, colonizando rápidamente los tejidos y ocasionando la necrosis de los mismos. La expansión del patógeno en la espiga se produce a partir de los conductos vasculares que

unen entre sí las flores dentro de las espiguillas y las espiguillas dentro de la espiga. Períodos prolongados de tiempo húmedo favorecen la colonización, pudiendo el crecimiento de *F. graminearum* ocurrir incluso en la superficie de las glumas y glumelas (Sutton 1982). El tejido colonizado se decolora prematuramente ocasionando el síntoma de tizón característico de la FET, pudiendo este blanqueamiento alcanzar a varias de las espiguillas de la espiga (Bushnell *et al.* 2003).

Sobre la superficie de los tejidos infectados, el patógeno produce grandes cantidades de esporas asexuales (conidios), las cuales se agrupan en esporodoquios formando masas de consistencia pegajosa y de coloraciones anaranjadas denominadas pionnotes (Trail 2009).

*Fusarium graminearum* cumple la mayor parte de su ciclo como un organismo haploide. En condiciones de cultivo el desarrollo sexual ocurre usualmente en los restos de cosecha y comienza con la formación de hifas de células binucleadas. *F. graminearum* es un ascomicota homotálico, es decir que no necesita de otro individuo para el desarrollo de las esporas sexuales (ascosporas). Como resultado, ambos núcleos de la célula binuclear son genéticamente idénticos. Estas células dan origen a la formación de los peritecios dentro de los cuales se encuentran las ascas, sacos tubulares que contienen a las ocho ascosporas generadas como producto de la meiosis y la mitosis.

El peritecio constituye una estructura ostiolada, y es desde esta abertura que las ascosporas son liberadas en forma activa al aire. Estas esporas, diseminadas por el viento, constituirán el inóculo primario para el desarrollo de la enfermedad durante la estación de cultivo siguiente.

### 1.2.2. Sintomatología y daños

Los primeros síntomas de la infección ocurren en las primeras flores en alcanzar la antesis, que generalmente son las ubicadas al centro de la espiga. Las infecciones iniciales aparecen como manchas acuosas pequeñas de coloración amarronada entre la base y la mitad de las glumas o en el raquis (Bushnell *et al.* 2003). A medida que la enfermedad progresa, las manchas se decoloran y los síntomas se expanden por la espiga en ambas direcciones (Figura 2).

La totalidad de la porción apical de la espiga ubicada sobre una espiguilla infectada puede secarse y tomar la coloración de las espigas maduras. En ataques extremos, puede ser observada la presencia de hifas del patógeno de coloraciones salmón a rosadas en los márgenes de las glumas o en la base de las espiguillas afectadas, mientras que es frecuente la necrosis del raquis de las espigas (Parry *et al.* 1995).

Bajo condiciones ambientales húmedas, gran número de esporas asexuales (macroconidios) son formadas en la superficie de las espigas infectadas en masas mucilaginosas crecidas en esporodoquios (estructuras de hifas reproductivas) de coloraciones anaranjadas a salmón (Trail 2009). Los macroconidios son producidos entre 16°C y 36°C, con un óptimo de 32°C (Andersen 1948). La producción de estas

esporas requiere además de condiciones húmedas, siendo máxima con potenciales hídricos de  $-0,14$  MPa (Sutton 1982).



**Figura 2** – Espigas de trigo con síntomas necróticos en espiguillas ocasionados por la Fusariosis de la Espiga.

En períodos prolongados de tiempo cálido y húmedo las espiguillas de espigas infectadas frecuentemente desarrollan peritecios de coloraciones azules a negras en su superficie (Parry *et al.* 1995). Los peritecios pueden formarse con temperaturas de entre  $5^{\circ}\text{C}$  y  $35^{\circ}\text{C}$ , con un óptimo de  $29^{\circ}\text{C}$ , mientras que la producción de ascosporas ocurre entre los  $13^{\circ}\text{C}$  y los  $33^{\circ}\text{C}$ , con óptimos de entre  $25^{\circ}\text{C}$  y  $28^{\circ}\text{C}$  (Sutton 1982). La maduración de estos peritecios en condiciones de campo requiere de entre dos y tres semanas (Sutton 1982).

Con alta humedad relativa y ambiente templado, el patógeno ingresa en el grano en formación ocasionando abortos en las flores en ataques tempranos (McMullen *et al.* 1997). La infección de los granos en desarrollo produce en los mismos manchas color marrón oscuro que se diseminan y coalescen de forma que la totalidad del grano maduro puede aparecer decolorado (Bushnell *et al.* 2003) (Figura 3).

Los granos altamente afectados, de apariencia “atizada”, pueden presentarse parcial o completamente cubiertos por micelio de coloración rosada o blanca resultando en reducciones del rendimiento y la calidad del cultivo (Trigo-Stockli *et al.* 1998), principalmente debidas a la disminución del peso hectolítrico (PH) y tenor proteico del grano que afectan la calidad de las harinas y de los subproductos, cuyo valor comercial se ve reducido (Goswami y Kistler 2004). En casos extremos, la producción de un gran número de lotes puede quedar fuera del estándar de comercialización, originando no

sólo importantes rebajas en el precio del producto, sino además el rechazo en las terminales portuarias (de Galich 1997).



**Figura 3** – Granos de trigo con daño visible ocasionado por la Fusariosis de la Espiga (granos “atizados”)

A los daños que la enfermedad provoca sobre el rendimiento y la calidad del trigo, se suma la contaminación del grano con micotoxinas sintetizadas por el patógeno, como el deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) y zearalenona (ZEA) (Lori *et al.* 1992; 2003; Rizzo *et al.* 1997; González *et al.* 2008), que, debido a que constituyen un riesgo para la salud, comprometen la utilización del grano en la alimentación. Junto con la infección de las flores, el hongo expresa los genes de biosíntesis de micotoxinas y la invasión de los granos en formación por el micelio del hongo es acompañada por su acumulación en los mismos. Esto último habitualmente genera más perjuicios que la pérdida de rendimiento, debido a los estándares de calidad impuestos por los mercados externos para el trigo en lo que hace al contenido de toxinas en los granos (<http://www.codexalimentarius.net>).

### 1.2.3. Impacto de la Fusariosis de la Espiga en la producción de trigo

Desde su descripción en los últimos años del siglo XIX, numerosas epidemias de FET se han producido en casi todas las regiones productoras de trigo a nivel mundial. Canadá, EE.UU., Europa, Asia del Este y América del Sur han sido las regiones más ampliamente afectadas por la presencia de la enfermedad.

Al menos 10 epidemias de FET fueron reportadas entre la última década del siglo XIX y las dos primeras del XX en los EE.UU. La más importante, en 1919, provocó pérdidas de más de 2 Mt, con infecciones de hasta el 69% de la superficie sembrada. En 1928 una gran epidemia afectó fundamentalmente a los cultivos de cebada, y al menos 14 ataques severos de la enfermedad fueron registrados en distintos estados entre 1935 y 1980 (Stack 2003). En 1982, la FET causó pérdidas estimadas en 2,72 Mt de trigo, el 4% del total de la producción de los EE.UU. (McMullen *et al.* 1997). En Canadá, por su



parte, epidemias severas de FET han ocurrido en 1940, 1942, 1945, 1957, 1978, 1980 y 1982 (Stack 2003).

La enfermedad es endémica en China (McMullen *et al.* 1997), el mayor productor de trigo a nivel mundial. En más de la mitad de los 40 años comprendidos entre 1950 y 1990 se registraron en este país epidemias moderadas a severas de FET (Stack 2003), con pérdidas de producción de hasta 5 Mt y disminuciones del rendimiento cercanas al 40% en algunos lotes (Parry 1995).

Similares perjuicios han sido reportados en Rumania, Hungría e India, con daños que en algunos casos alcanzan el 70%. En Irlanda, la epidemia de FET de 1942 ocasionó la pérdida de un tercio de la producción de trigo mientras que en Rusia, aproximadamente el 10% de la población sufrió los síntomas de la Leucopenia Tóxica Alimentaria (Alimentary Toxic Aleukia - ATA), ocasionada por las micotoxinas producidas por *F. sporotrichioides* (Stack 2003).

En Asia del Este, numerosos ataques de FET han sido documentados, incluyendo una epidemia de intoxicados por el consumo de granos contaminados por micotoxinas ocurrida en Japón en 1932 (Stack 2003). En Corea del Sud, los severos daños ocasionados por la enfermedad en 1963 amenazaron seriamente la alimentación de parte de la población (McMullen *et al.* 1997).

En la Argentina, si bien está presente desde la década del 20, la enfermedad se extendió en la región triguera en la campaña agrícola 1945/46 (de Galich 1997). A partir de este momento, las condiciones climáticas reinantes durante la floración del trigo, período de mayor susceptibilidad al ataque del patógeno, suelen desencadenar epidemias en las distintas subregiones trigueras.

En el país cerca de 20 epidemias de FET de variada intensidad fueron registradas en los últimos 50 años del siglo XX, las de mayor severidad en las campañas 1945-46, 1976, 1978, 1985, 1993 y 2001 (Moschini y Fortugno 1996; de Galich 1997; Kikot *et al.* 2011). El cuadrante Noreste de la región pampeana observa la más alta potencialidad climática respecto a la FET, pudiéndose registrar de 4 a 6 ataques severos en 20 años. De Noreste a Sudoeste la probabilidad de ocurrencia de incidencias severas decrece paulatinamente en respuesta a la disminución de los niveles de precipitación, humedad relativa y temperatura que acompañan el período de floración del cultivo de trigo.

En la región central-norte de cultivo, los peores ataques de FET ocurrieron en 1978, 1985 y 1993, con daños promedio estimados de entre 20 y 30% y valores máximos de más de 50% en lotes cultivados bajo siembra directa sobre rastrojo de maíz. En la zona sudeste de producción, epidemias severas tuvieron lugar en 1963, 1976, 1978 y 1985, con pérdidas de hasta el 70% de la producción (de Galich 1997).

Durante la campaña triguera 2012/2013, el volumen de lluvias registrado sobre la región de cultivo de trigo resultó muy superior a los valores históricos. Esto ocasionó un ambiente favorable para el desarrollo de las enfermedades foliares y principalmente de la fusariosis de la espiga que tuvo un alcance generalizado (Informe especial sobre cultivos – Guía Estratégica para el Agro AÑO IV - N° 041 - 14/12/2012, disponible en [http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/Informe%20especial%20041%202012\\_12\\_14.pdf](http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/Informe%20especial%20041%202012_12_14.pdf)). Bajo estas condiciones, los cultivos de trigo se vieron

afectados por ataques generalizados de FET que impactaron sensiblemente sobre el peso de los granos, reportándose pesos hectolítricos por debajo de la base y mermas del rendimiento de hasta el 60% en algunos lotes (Seguimiento semanal de cultivos Zona Núcleo – Guía Estratégica para el Agro AÑO VI - N° 282–29/11/2012, disponible en [http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/GEA%20282\\_2012\\_29\\_11.pdf](http://www.bcr.com.ar/GEA%20Archivos%20Diarios/Informes/GEA%20282_2012_29_11.pdf)).

Durante esta última campaña, el Laboratorio de Calidad Industrial de Cereales y Oleaginosas de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Marcos Juárez del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) analizó la calidad de muestras de trigo obtenidas en las principales localidades del sur de Santa Fe, sudeste de Córdoba y norte de la Pcia. de Buenos Aires, en la Subregión Triguera II Norte (IIN), y del centro-sur de la Pcia. de Córdoba, en la Subregión V Norte (VN). El porcentaje de granos fusariosos promedio encontrado fue de 4,7 % para la subregión IIN y de 1,4% en la VN, con máximos de hasta 11% en algunas muestras (Cuniberti *et al.* 2013).

En 1976, la epidemia que afectó los cultivos de trigo fideos (*Triticum durum* Desf.), que constituían el 20% de la superficie cultivada con trigo en la región, ocasionó que el 60% de los lotes cayeran fuera del estándar de producción. Esta situación contribuyó al desplazamiento de la producción de trigo fideos en la zona en beneficio del trigo pan, de mejor comportamiento frente a la enfermedad. En 1984, solo el 3,5% de la superficie total cultivada con trigo en la zona correspondió a cultivares de *T. durum* (de Galich 1997).

#### 1.2.4. Manejo de la Fusariosis de la Espiga de Trigo

La combinación de las características epidemiológicas del patógeno, la escasa resistencia presente en los genotipos de trigo a la FET y la importante influencia de los factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad hacen necesaria la adopción de un grupo diverso de técnicas que permitan la disminución de la incidencia y la severidad del ataque de los patógenos (Parry *et al.* 1995; de Galich 1997).

El manejo de la FET mediante controles culturales resulta complejo debido a que *F. graminearum* es un patógeno facultativo con un amplio rango de hospedantes incluyendo malezas y especies gramíneas y no gramíneas cultivadas (de Galich 1997). Peritecios de la forma sexual *G. zeae* han sido encontrados en rastrojos de maíz, trigo, cebada, sorgo, moha, avena, centeno y en restos secos de otras gramíneas como *Lolium multiflorum*, *Paspalum dilatatum*, *Sorghum halepense*, *Cynodon dactylon*, *Avena* spp., *Digitaria sanguinalis* (Kohli *et al.* 1995). En girasol, por su parte, se ha verificado la colonización por *F. graminearum* aunque no se halló producción de ascosporas en ese sustrato (Pereyra *et al.* 2004a).

Recientemente se ha postulado que también las malezas podrían actuar como importante fuente de inóculo para el desarrollo de epidemias de FET. El comportamiento de las especies vegetales espontáneas en el hemisferio sur, donde las condiciones climáticas reinantes en el período invernal permiten la supervivencia y la constante presencia de las malezas en los sistemas agronómicos, difiere considerablemente del que puede presentarse en el hemisferio Norte. Trabajos realizados en Uruguay (Pereyra *et al.* 2004b) han demostrado que si bien las malezas

gramíneas producen menor cantidad de ascosporas que otros restos vegetales, su producción en el hemisferio sur es continua. Pereyra *et al.* (2004b) mencionan que las malezas con hábito de crecimiento estival que permanecen secas durante el invierno y la primavera podrían tener un rol epidemiológico en los sistemas de producción de América del Sur. En la Argentina, Mourellos *et al.* (2011) efectuaron monitoreos bimestrales de inflorescencias de malezas durante la campaña 2010/11 con el objetivo de analizar su capacidad potencial como fuente de inóculo. Sobre 68 especies botánicas pertenecientes a las monocotiledóneas y dicotiledóneas evaluadas se detectó la presencia de *F. graminearum* en el 100% de las inflorescencias analizadas, a pesar de que no se detectó la ocurrencia de ningún tipo de síntoma en los diferentes muestreos realizados. Mediante monitoreos mensuales de la presencia de ascosporas de *G. zeae* como inóculo aéreo en el Sur del Brasil, Reis *et al.* (1988) concluyeron que en el aire existe inóculo durante todo el año.

La naturaleza ubicua de *F. graminearum* y la dependencia del proceso infectivo de las condiciones ambientales no permitirían que el control de la FET sea posible con la rotación de cultivos por sí sola (Reis 1990; Bai y Shaner 1994). Sin embargo, prácticas de control cultural, como una adecuada rotación de cultivos, y el control de malezas podrían contribuir a disminuir la cantidad de inóculo primario para la FET disponible al momento de máxima susceptibilidad del cultivo. Los trabajos de Mc Mullen *et al.* (1997) y Dill-Macky y Jones (2000) han sugerido que las rotaciones donde están ausentes maíz, trigo o cebada pueden reducir el nivel de la enfermedad. Dill-Macky y Jones (2000) evaluaron el efecto del cultivo previo y el tipo de labranza sobre el desarrollo de la FET y hallaron que los índices de la enfermedad resultaron mayores cuando el cultivo antecesor fue una gramínea (trigo y maíz) con respecto a soja. Sin embargo, resultados contrastantes fueron obtenidos en los últimos años en la Argentina donde se ha demostrado que cultivos como la soja también actuarían como importante reservorio de inóculo en el suelo. Pioli *et al.* (2004) sugieren que las diferentes estrategias de supervivencia y dispersión del inóculo inicial de *F. graminearum* debilitan el efecto de las prácticas de rotación y manejo de los rastrojos sobre las enfermedades que causa este hongo en el trigo y el maíz. Más aún, los resultados informados por los autores sobre la asociación *F. graminearum*-soja sugerirían que la efectividad del control cultural basado en la rotación maíz-soja-trigo/soja debería ser reevaluada ya que no interrumpiría el ciclo de *F. graminearum*.

En cuanto al efecto del laboreo, por otra parte, Dill-Macky y Jones (2000) encontraron que los menores índices de FET fueron obtenidos con la implementación de técnicas de labranza convencional mientras que no hubo grandes diferencias entre la siembra directa y la preparación del terreno con cincel. Gilbert y Tekauz (2000), por su parte, no encontraron impactos significativos del cultivar, la rotación y la labranza sobre el peso de las muestras cosechadas con granos fusariosos, aunque los autores reconocen que una alta presión de inóculo podría haber enmascarado las posibles diferencias existentes. Miller *et al.* (1998) analizaron el efecto de distintos tipos de manejo del cultivo, fundamentalmente las labranzas, en la incidencia de la FET y concluyeron que las condiciones del clima resultaron en todos los casos de mayor influencia que el tipo de laboreo en el desarrollo de la enfermedad. En experiencias realizadas en la Argentina en parcelas de trigo bajo condiciones naturales de infección durante tres campañas consecutivas, se observó que el efecto de las labranzas (convencional y cero) y otras prácticas agronómicas resultó de escasa influencia sobre el desarrollo epidémico de la fusariosis ante la ocurrencia de condiciones ambientales conducentes (Lori *et al.* 2009).



El uso de fungicidas, por su parte, constituye solo una medida complementaria de control de la enfermedad, posible de ser utilizada cuando las condiciones ambientales resultan conducentes para el desarrollo de la FET alrededor de la antesis. Sin embargo, la eficiencia en la aplicación de esta medida resulta incierta debido a la característica preventiva de la utilización de fungicidas, a los altos costos y la ineficiencia en la aplicación de los tratamientos, y a la escasa eficiencia de los productos químicos disponibles en el control de la FET (Parry *et al.* 1995; de Galich 1997; McMullen *et al.* 1997).

La dependencia de la FET de los factores ambientales ha impulsado en la Argentina el desarrollo de modelos de pronóstico de la enfermedad con base meteorológica (Moschini y Fortugno 1996; Moschini *et al.* 2001; 2002; Kikot *et al.* 2011). Estos modelos, y la red de alerta resultante de su aplicación, permiten conocer el riesgo de ocurrencia de ataques de FET de acuerdo con las condiciones climáticas y el estadio del ciclo en que se encuentre el cultivo, facilitando la determinación del momento óptimo para la aplicación de los tratamientos fungicidas.

La baja eficiencia del uso de otras prácticas para el mantenimiento de bajos niveles de ataque de la FET, hacen que la principal alternativa para el manejo de la enfermedad sea el uso de genotipos de trigo de buen comportamiento frente al ataque del patógeno. Sin embargo, la naturaleza esporádica de la FET y la falta de cultivares de trigo inmunes a la enfermedad han resultado en esfuerzos intermitentes en los programas de mejoramiento del cultivo de trigo (Dill-Macky 2003; Mesterházy 2003). Actualmente, y debido a un contexto mundial de creciente preocupación por la inocuidad de los alimentos, la capacidad toxicogénica de muchos de los organismos causantes de la FET han hecho que el desarrollo de cultivares de trigo que incorporen caracteres que mejoren su comportamiento frente a la enfermedad constituya un problema global que resulta de crucial importancia para el mejoramiento de este cereal (Mesterházy 2003).

Para la obtención de cultivares de trigo tolerantes o resistentes que permitan minimizar las pérdidas ocurridas como consecuencia de la FET, el conocimiento de la agresividad de los aislamientos a ser utilizados en la evaluación de la resistencia de los genotipos resulta de fundamental importancia (Mesterházy 2003). Asimismo, el conocimiento de la estructuración de la agresividad en las poblaciones del patógeno permitiría estimar la durabilidad de la resistencia obtenida por los programas de mejoramiento (Miedaner y Schilling 1996).

Numerosos estudios indican que existiría amplia variabilidad en la agresividad<sup>2</sup> de los aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de muestreos en distintas escalas

---

<sup>2</sup> En el ámbito de la patología vegetal existe escaso consenso entre los autores respecto de la correcta utilización de los términos relativos a la patogenicidad, virulencia y agresividad de los organismos patógenos vegetales (Shaner *et al.* 1992; Andrivon 1993; 1995; Hunt 1994; Bos y Parlevliet 1995). Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizarán las definiciones de estos términos utilizadas por van der Plank (1968) y Andrivon (1993; 1995). Así, se entenderá como patógeno a aquel organismo capaz de producir enfermedad cuando se enfrenta a un hospedante susceptible. La virulencia, por su parte, se entenderá como un rasgo cualitativo (van der Plank 1968) y se considerará como patógeno virulento para un determinado genotipo hospedante aquel “capaz de infectarlo y, usualmente, de reproducirse en él” (Andrivon, 1993). De esta definición se desprende que no todos los genotipos que constituyen la especie hospedante de determinado patógeno son susceptibles de ser enfermos por éste. Generalmente, una

espaciales: diferentes partes del mundo (Bai y Shaner 1996; Miedaner *et al.* 2001), países o regiones dentro de estos (Dusabenyagasani *et al.* 1999; Walker *et al.* 2001) e incluso lotes de producción (Miedaner y Schilling 1996).

Si bien la variabilidad en la agresividad presente en los aislamientos de *F. graminearum* ha sido demostrada en distintas áreas del mundo, los estudios al respecto para las poblaciones del patógeno de distintas áreas de cultivo de la Argentina son escasos. El conocimiento de la variabilidad de la agresividad de las poblaciones de *F. graminearum* de la Argentina es información básica e indispensable para su utilización en la búsqueda de genotipos de trigo resistentes a la FET en el país.

Las causas que influyen la patogenicidad y la agresividad en los patógenos vegetales no son comprendidas en su totalidad (Pariaud *et al.* 2009). En las poblaciones de *F. graminearum*, diferencias cualitativas y cuantitativas en la producción de enzimas y micotoxinas, principalmente del grupo de los tricotecenos, han sido indicadas como posibles causas de la gran variabilidad de las cepas en este aspecto (Miedaner *et al.* 2000). Sin embargo, el rol de estos metabolitos en el desarrollo de la FET no está claro (Cumagun *et al.* 2004; Pariaud *et al.* 2009). Una posible correlación entre la agresividad de los aislamientos y la producción de DON por parte de *F. graminearum* y *F. culmorum* ha sido reportada (Desjardins *et al.* 1996; Wang *et al.* 2006), aunque otros autores no han encontrado correlación o ésta ha sido inconsistente (Adams y Hart 1989; Liu *et al.* 1997; Arseniuk *et al.* 1999; Walker *et al.* 2001; Copia 2012).

### 1.3. Justificación

En 2011, la población mundial alcanzó los 7 mil millones de personas y se espera que continúe creciendo en los próximos años hasta alcanzar los 9 mil millones en 2050 (IFPRI 2012). Este incremento poblacional aumentará enormemente la demanda de alimentos en los próximos años. Se estima que para satisfacer los requerimientos de alimentación de una población en creciente incremento, para el año 2020 la producción mundial anual de trigo deberá alcanzar las 1.000 Mt (Rajaram 2001). El incremento del rendimiento medio resulta la estrategia más factible para alcanzar estos valores de producción, ya que el aumento de la superficie sembrada parece poco posible.

Para alcanzar los niveles de demanda proyectados, los rendimientos medios mundiales deberían aumentar a 4 t/ha, valor 25% superior al promedio actualmente obtenido (Rajaram 2001). Entendiendo el rendimiento potencial como aquel que se obtiene cuando un cultivar es sembrado en ambientes a los cuales se encuentra adaptado, sin limitantes hídricas ni nutricionales y en ausencia de plagas, enfermedades, malezas u otros estreses (Evans y Fischer 1999), las posibilidades de incrementar los rendimientos a futuro dependerán en buena medida de nuestra capacidad de estrechar la brecha que existe entre los rendimientos actuales y los potenciales. En este contexto se vuelve indispensable el mejoramiento de las condiciones de producción, y para ello la protección de los cultivos frente a factores adversos, y dentro de ella la obtención de cultivares resistentes, juega un papel fundamental.

---

parte de éstos genotipos resulta resistente al ataque del patógeno, que es avirulento en ellos (Andrivon, 1993). Por último, se utilizará la agresividad según la definición de van der Plank (1968) para designar la cantidad de enfermedad inducida por un aislamiento patogénico a un hospedante susceptible.

Más de un tercio del potencial de producción mundial de alimentos se pierde cada año a consecuencia del ataque de malezas, plagas y enfermedades (Oerke y Denhe 2004). Sobre un valor estimado de la producción mundial anual de cultivos agrícolas de aproximadamente 1,5 billones de dólares, cerca de 500 mil millones de dólares se pierden cada año a consecuencia del efecto de estos factores adversos. Aproximadamente 38.000 millones de dólares se invierten anualmente a nivel mundial en la prácticas de protección de cultivos mediante pesticidas (fungicidas, insecticidas y herbicidas) que previenen pérdidas adicionales cercanas a los 450.000 millones de dólares anuales (Oerke y Denhe 2004).

Las estimaciones de los daños sobre el rendimiento en el caso del cultivo del trigo superan el 50% de la producción. Los mayores daños resultan de la presencia de malezas (23%), seguidos por el ataque de patógenos fúngicos y bacterianos (16%), los insectos (9%) y los virus (3%). Las medidas de protección reducen este potencial de daño en cerca de un 50%, sin embargo las pérdidas totales varían considerablemente entre las distintas regiones mundiales. Mientras que en el Noroeste de Europa éstas alcanzan aproximadamente un 14% de la producción, en África Central, el Sudeste Asiático y Oceanía estas cifras pueden alcanzar valores de 35% o superiores (Oerke y Denhe 2004).

Uno de los principales patógenos fúngicos que ocasiona mermas en el rendimiento del cultivo de trigo y perjudica la comercialización del grano obtenido es *F. graminearum*, agente causal de la FET. El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ha identificado a esta enfermedad como uno de los factores limitantes para la producción triguera en numerosas regiones mundiales (Dubin *et al.* 1997), con pérdidas anuales que oscilan entre el 10 y el 30% según las áreas de cultivo (Kohli *et al.* 1995; de Galich 1997).

Los estudios necesarios para diagramar una estrategia de manejo de la FET exitosa deberían incluir el análisis de la diversidad a nivel genético de las poblaciones de *F. graminearum* presentes en las áreas de cultivo del trigo, el estudio de la diversidad de la agresividad de los aislamientos y la relación entre la producción de toxinas y la agresividad de las cepas. El conocimiento de la diversidad genética y patogénica es de fundamental importancia para la mejor comprensión de la dinámica de la FET y para la toma de decisiones en la selección de estrategias de mejoramiento vegetal tendientes a obtener materiales con resistencia o tolerancia a la enfermedad. En este sentido, resulta de fundamental importancia la profundización en el análisis de la toxicogenia de las poblaciones de *F. graminearum* presentes en el país.

Es en los aspectos citados que se fundamenta el desarrollo de la presente tesis doctoral, buscando realizar un significativo aporte al conocimiento de la dinámica de una enfermedad tan importante para la producción como es la FET.

## HIPÓTESIS

- Las poblaciones de *F. graminearum* que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan niveles de agresividad y capacidad toxicogénica similares y albergan la misma diversidad a nivel genético.

- La agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires está directamente relacionada con la producción de deoxinivalenol de las mismas.

## OBJETIVOS

- Obtener aislamientos de *F. graminearum* de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires.
- Analizar la diversidad genética presente en las poblaciones de *F. graminearum* provenientes de distintas localidades de la Región Pampeana.
- Determinar la agresividad de los aislamientos.
- Cuantificar la capacidad de producción de tricotecenos de los aislamientos de *F. graminearum*.
- Correlacionar la acumulación de tricotecenos con la agresividad y la capacidad de expansión en la espiga de los aislamientos de *F. graminearum*.

## **CAPÍTULO II**

### **IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE *F. GRAMINEARUM* DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

---

**Parcialmente publicado en:** I. Malbrán, C.A. Mourellos, J.R. Girotti, M.B. Aulicino, P.A. Balatti, y G.A. Lori. 2012. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. Crop Protection 42: 234–243



## CAPÍTULO II

### Identificación taxonómica y variabilidad genética de aislamientos de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires

#### **2.1. INTRODUCCIÓN**

##### **2.1.1. Breve historia de la taxonomía del género *Fusarium***

Desde que fuera descrito por primera vez por Link en 1809, la importancia del género *Fusarium* como agente causal de diversas enfermedades en un amplio número de cultivos de importancia económica ha hecho de éste un género ampliamente estudiado. Distintas escuelas taxonómicas han prevalecido a lo largo de los años y el concepto de especie dentro del género ha variado enormemente entre criterios amplios y estrechos (Leslie y Summerell 2006). Como consecuencia, la historia de la sistemática del género (y de *F. graminearum* como una de sus especies más importantes) resulta compleja.

La mayor parte de la investigación temprana en el género *Fusarium* se enfocó en el diagnóstico y la identificación de las especies causantes de enfermedades en las plantas utilizando como principal carácter la forma de sus conidios descrita por Link. En poco tiempo, más de 1.000 especies habían sido identificadas y caracterizadas dentro del género (Leslie y Summerell 2006). El primer intento de organizar y ordenar a las especies de *Fusarium* tuvo lugar en 1935 con la publicación del trabajo de Wollenweber y Reinking sobre la taxonomía del género, el cual constituyó el material de referencia más importante para los trabajos subsiguientes. Los autores reformularon las más de 1.000 especies reconocidas hasta ese momento sobre la base de caracteres morfo-fisiológicos (fundamentalmente aquellos relacionados con la producción, forma y tamaño de las esporas), reduciéndolas a 65 y ubicándolas dentro de 16 secciones (Wollenweber y Reinking 1935).

Durante las décadas de 1940 y 1950, Snyder y Hansen publicaron cuatro artículos en los que reconfiguraron la taxonomía del género, reduciendo el número de especies a 9 (Snyder y Hansen 1940; 1941; 1945; 1954). Dentro de los cambios más importantes implementados, 4 de las 16 secciones definidas por Wollenweber y Reinking fueron reducidas a una única especie, *F. roseum*, dentro de la cual se ubicó a *F. graminearum*. El uso y los estudios posteriores de esta clasificación permitieron concluir que esta reducción no podía ser justificada y debía abandonarse (Nelson 1991). Sin embargo, las bases establecidas en los trabajos de Snyder y Hansen persistieron por casi 50 años, derivaron en grandes pérdidas de información y ocasionaron que los resultados obtenidos durante esos años resultasen difíciles de evaluar e interpretar *a posteriori*. A pesar de ello, algunos de los aportes realizados por los autores, como la importancia de los aislamientos monospóricos en la correcta identificación de las especies o la amplia variabilidad intra-específica presente en el género (incluso entre sub-cultivos pertenecientes a un único aislamiento monospórico), mantienen su vigencia.

Durante la década del 1970 y principios de 1980, los trabajos de Wollenweber y Reinking fueron retomados por un gran número de autores, derivando en la obtención de una serie de esquemas de clasificación que intentaron arrojar luz sobre la complejidad del género (Booth 1971; Gerlach y Nirenberg 1982; Nelson *et al.* 1983). Entre ellos se destaca el trabajo de Colin Booth (1971), investigador fitopatólogo del

Commonwealth Mycological Institute (CMI). En su influyente trabajo monográfico, que describe 44 especies de *Fusarium*, focalizó la identificación taxonómica en la morfología de los conidios y en la estructura que le da origen a los mismos, la célula ontogénica, a la cual consideraba una de las características más estables del género. El manual de identificación producido posteriormente por Nelson *et al.* (1983) en EE.UU. constituyó una nueva aproximación a la identificación taxonómica de las especies del género y el alejamiento definitivo de la sistemática desarrollada por Snyder y Hansen.

En la actualidad, a pesar de que la mayor parte de las especies continúan siendo descritas a partir de conceptos morfo-fisiológicos, la aplicación del concepto biológico y filogenético de especie dentro del género *Fusarium* ha ganado relevancia.

### 2.1.2. El complejo de especies de *F. graminearum*

En 1977 Francis y Burgess distinguieron 2 grupos dentro de *F. roseum* “Graminearum”. Aquellos aislamientos homotáticos capaces de producir los síntomas de la FET fueron ubicados dentro del “grupo 2”, para distinguirlos de aquellos heterotáticos causantes de síntomas de pudrición de la corona (o CR, acrónimo en inglés de crown rot), a los cuales se ubicó dentro del “grupo 1” (Francis y Burgess 1977). Esta separación se mantuvo una vez que *F. graminearum* recuperó su condición de especie y hasta el año 1999, cuando se descubrió que el llamado “grupo 1” constituye una especie heterotática actualmente identificada como *F. pseudograminearum* (teleomorfo *Gibberella coronicola*) (Aoki y O'Donnell 1999).

A través del análisis de secuencias de ADN genómico de aislamientos provenientes de distintas partes del mundo, O'Donnell *et al.* (2000) dividieron a *F. graminearum* en 7 linajes estructurados biogeográficamente. Los autores describieron 5 linajes en el Hemisferio Sur, 2 en América del Sur y Central (linajes 1 y 4) y 3 en África (linajes 2; 3 y 5); y sólo 2 en el Hemisferio Norte, uno restringido a Asia (linaje 6) y el restante (linaje 7) perteneciente a una población presente en el Norte de Europa y EE.UU.

Estudios posteriores, sin embargo, no mostraron coincidencia con la descripción de algunos de los linajes (Carter *et al.* 2000; 2002) o demostraron que los mismos no se encuentran estrictamente confinados a las regiones geográficas para las que fueron descritos: aislamientos del linaje 6 han sido reportados en Brasil y EE.UU. (Gale *et al.* 2005), mientras que otros pertenecientes a los linajes 2, 3 y 7 se encontraron en China (Gale *et al.* 2002) y en Europa ha sido informada la presencia de los linajes 3 y 4 (Tóth *et al.* 2005).

Como resultado del análisis filogenético de secuencias de ADN de porciones de 11 genes de estos 7 linajes, O'Donnell *et al.* (2004) propusieron más tarde la división de *F. graminearum* en un complejo de 9 especies filogenéticamente distintas. Más recientemente, los trabajos de Starkey *et al.* (2007), O'Donnell *et al.* (2008) e Yli-Mattila *et al.* (2009) han llevado a al menos 13 el número de especies que conformarían este complejo.

En la Argentina, las investigaciones realizadas sobre la estructura del complejo de especies de *F. graminearum* patógenas de trigo han identificado únicamente la



presencia de *F. graminearum sensu stricto* (Ramírez *et al.* 2007; Sampietro *et al.* 2010). En maíz, por su parte, se encontraron además cepas pertenecientes a *F. meridionale* y *F. boothii* (Sampietro *et al.* 2010; 2011).

La delimitación de las especies filogenéticas dentro del complejo *F. graminearum* ha sido establecida fundamentalmente mediante concordancia genealógica utilizando las divergencias en la secuencia de un número limitado de genes, dificultando la identificación taxonómica utilizando parámetros morfo-fisiológicos. Esto ha hecho que la aceptación de la nueva nomenclatura no haya sido completa hasta el momento (Miedaner *et al.* 2008).

### **2.1.3. Diversidad genética en las poblaciones de *Fusarium***

El aspecto fundamental de la genética de poblaciones consiste en determinar el nivel de variabilidad genética dentro de una población o colección de aislamientos (Gale 2003). Marcadores tanto fenotípicos como moleculares han sido utilizados para examinar la variabilidad genética en las especies de *Fusarium*.

Dentro de los marcadores fenotípicos, han sido ampliamente utilizados los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG). La metodología se basa en la capacidad de anastomosis y fusión de las hifas que permite la formación de un heterocarión (Puhalla 1985). En la mayoría de los Ascomycetes, la formación del heterocarión está limitada por los genes de compatibilidad vegetativa que previenen la fusión de las hifas y la transmisión de los núcleos entre aislamientos que presenten diferencias en ellos (Gale 2003). Mediante la generación de mutantes auxotróficos y pruebas de complementación genética, la técnica de VCG permite estimar las diferencias existentes en los genes de compatibilidad vegetativa entre individuos (Puhalla 1985; Correll *et al.* 1987; Bowden y Leslie 1992).

Los VCG constituyen una herramienta esencial en el análisis de la diversidad genética presente en las especies fúngicas de reproducción exclusivamente asexual como *F. oxysporum*. Sin embargo, la amplia diversidad de VCGs presente en las poblaciones de *F. graminearum* hace que estos marcadores no se adapten a los estudios de la variabilidad genética dentro de la especie (Gale 2003).

Las técnicas moleculares son herramientas que permiten caracterizar el genoma de los integrantes de las poblaciones y analizar la diversidad de las mismas, mediante la utilización de distintos tipos de marcadores moleculares y genéticos, los que difieren en la información que nos brindan sobre los genomas.

#### **2.1.3.1. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares muestran características estructurales de los genomas de los individuos, cuyas diferencias revelan variaciones en el genotipo. Son neutros porque, en contraposición con los marcadores morfológicos, no están influenciados por el ambiente y muestran las diferencias independientemente de que las mismas se reflejen en el fenotipo. Este constituye uno de los motivos por los cuales estos marcadores son preferidos por sobre los morfológicos (Jones *et al.* 1997).

El descubrimiento simultáneo de las enzimas de restricción (endonucleasas), la transformación bacteriana y la electroforesis en geles de agarosa constituyeron las bases del desarrollo de la biología molecular en la década de 1970 (Reece 2004). Las enzimas de restricción reconocen ciertas secuencias de bases en el ADN y cortan el mismo en estos sitios (Smith y Wilcox 1970), capacidad que permitió clonar genes para su estudio. El desarrollo de la electroforesis submarina en geles de agarosa o poliacrilamida, por su parte, permitió separar, identificar y purificar los fragmentos de ADN obtenidos. La técnica de electroforesis es simple y rápida, y permite resolver los fragmentos de ADN que no pueden ser separados adecuadamente mediante otros procedimientos tales como la centrifugación en gradientes de densidad (Sambrook y Russell 2001). Estos avances, junto con el desarrollo de las técnicas de clonado en vectores bacterianos (Cohen *et al.* 1973), se convirtieron en la piedra fundamental del desarrollo de la biología molecular.

Los rearrreglos genéticos (mutaciones, deleciones e inserciones de nucleótidos) generan cambios en las secuencias de ADN que pueden resultar en la generación de nuevos sitios de restricción o en la desaparición de otros, modificando su número y resultando en la aparición de polimorfismos. Esto conduce a que las endonucleasas corten al genoma de diversos individuos en distintos sitios, generando diferencias en los fragmentos de restricción obtenidos. Esta característica fue explotada para el desarrollo de los marcadores moleculares por polimorfismos de los fragmentos de restricción (o RFLP, acrónimo en inglés de Restriction Fragment Length Polymorphisms). Si bien estos marcadores demandan realizar procedimientos largos y costosos, que además requieren grandes cantidades de ADN, tienen la ventaja de ser altamente reproducibles (Jones *et al.* 2009).

Los trabajos de Saiki *et al.* (1985), Mullis *et al.* (1986) y Mullis y Faloona (1987) en la década de 1980 condujeron al desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR, acrónimo en inglés de Polimerase Chain Reaction). El proceso en sí mismo se desarrolló sobre la base de los conocimientos básicos de la replicación del ADN y consiste en sintetizar millones de copias de un fragmento de doble cadena, utilizado como molde, con una ADN polimerasa en presencia de un exceso de nucleótidos y oligonucleótidos de cadena corta (primers) que funcionan como arrancadores de la reacción (Reece 2004). Esta técnica permitió amplificar el ADN hasta en dos millones de veces, posibilitó la determinación de la secuencia de bases de los genes, y viabilizó una serie de nuevos experimentos que condujeron al desarrollo de potentes herramientas biotecnológicas.

La amplificación del ADN mediante PCR puede ser resumida en tres etapas, cada una de las cuales tiene lugar a distintas temperaturas:

- *desnaturalización del ADN*: las dos cadenas de la molécula de ADN son separadas calentando a 94°C.
- *apareamiento (hibridación) de los primers*: la temperatura se reduce rápidamente permitiendo la hibridación de cada primer con las secuencias complementarias que flanquean la región blanco del ADN. La temperatura de apareamiento depende del tamaño y secuencia de los primers utilizados y el nivel de especificidad requerido por cada reacción de PCR

- *extensión*: una ADN polimerasa se une al extremo 3' libre de cada uno de los primers ligados y adiciona nucleótidos para sintetizar la nueva cadena de ADN en la dirección 5' a 3' tomando como molde la secuencia de ADN blanco.

De esta forma, al finalizar un ciclo de PCR se obtiene una copia del ADN utilizado como molde. Cuando los ciclos son repetidos en presencia de exceso de primers y de enzima, se produce un aumento exponencial de la cantidad de copias del ADN blanco, llegando a alrededor de 30 millones luego de 20 ciclos (Reece 2004).

El descubrimiento de las ADN polimerasas termoestables y su utilización permitieron incrementar enormemente la eficiencia de la PCR (Lawyer *et al.* 1989). La *Taq* polimerasa, obtenida de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, es una proteína resistente a altas temperaturas, estable a los 94°C de temperatura de desnaturalización del ADN, y que presenta una actividad máxima de adición de nucleótidos a 72-80°C, temperatura que no afecta la especificidad del apareamiento entre los primers y el material genético, el cual se realiza a una menor temperatura. La utilización de polimerasas termoestables significó la posibilidad de incorporar la enzima una única vez en lugar de tener que hacerlo luego de cada ciclo de desnaturalización y permitió abrir camino a la automatización del método (Reece 2004) y al desarrollo de distintas técnicas moleculares para el análisis de la diversidad poblacional. Entre ellas se encuentran las técnicas de PCR por amplificación aleatoria de ADN polimórfico, más conocida por el acrónimo inglés RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.* 1990; Welsh y McClelland 1990); por polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (o AFLP, acrónimo inglés de Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.* 1995); por repeticiones de secuencias simples (o SSR, acrónimo inglés de Simple Sequence Repeats) (Tautz 1989); y por amplificaciones inter-repeticiones de secuencias simples (o ISSR, acrónimo inglés de Inter-Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.* 1994).

La técnica de RAPD consiste en la amplificación de fragmentos de ADN empleando primers de secuencias arbitrarias que se distribuyen al azar en el genoma (Williams *et al.* 1990; Welsh y McClelland 1990). La metodología presenta la ventaja de permitir analizar genes, regiones intergénicas o fragmentos de ADN sin necesidad de conocer previamente sus secuencias. Si bien el protocolo es relativamente simple, rápido y de bajo costo presenta como desventaja la escasa repetitividad de las reacciones, lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos en distintos laboratorios (Jones *et al.* 2009).

Como ya se ha mencionado, el número de sitios de restricción en el genoma puede variar como resultado de rearrreglos genéticos generando polimorfismos. La metodología de AFLP se basa en el corte del ADN genómico con endonucleasas que generan una cantidad variable de fragmentos, los cuales son posteriormente amplificados utilizando primers de secuencia complementaria a los extremos resultantes del corte. Estos primers poseen además bases arbitrarias en uno de sus extremos lo que resulta en una amplificación selectiva de solo algunos de los fragmentos, generando patrones de bandas de ADN de alta complejidad (Vos *et al.* 1995). El método resulta técnicamente complejo y costoso pero permite detectar un importante número de *loci* y con ello revelar un gran número de polimorfismos (Jones *et al.* 2009).

La técnica de SSR consiste en la amplificación de regiones del genoma que contienen secuencias simples (1 a 4 nucleótidos) repetidas en tándem (microsatélites). Para ello se utilizan primers de 20 a 30 bases, que son complementarios a las secuencias que flanquean al microsatélite (Tautz 1989). Estos marcadores tienen la ventaja de generar un número elevado de polimorfismos debido a la variación en la cantidad de repeticiones de los microsatélites, pero para ello resulta indispensable el conocimiento previo de las secuencias que los flanquean en el genoma de la especie a analizar (Jones *et al.* 2009). La técnica de ISSR, por su parte, utiliza la secuencia de estos microsatélites como primers y está orientada a amplificar las regiones del genoma inter-microsatelitales (inter-SSR), amplificando porciones de ADN flanqueadas por secuencias repetitivas ubicadas a menos de 5.000 pares de bases. Los primers utilizados presentan entre 15 y 25 bases y sus secuencias contienen 2, 3 o 4 bases repetidas en tándem. Pueden ser sin anclaje o presentar de 1 a 4 bases selectivas en los extremos 5' (anclaje 5') o 3' (anclaje 3'). Los primers hibridan en múltiples sitios del genoma y permiten la amplificación de segmentos de ADN de distinta longitud mediante PCR (Zietkiewicz *et al.* 1994). El método presenta las mismas ventajas que los marcadores RAPD a las que suma una mayor reproducibilidad, debida a la mayor longitud de la secuencia de los primers empleados que permite utilizar temperaturas de hibridación más altas, con el correspondiente incremento en la especificidad de la unión con el ADN molde (Jones *et al.* 2009).

#### 2.1.3.2. Diversidad genética de las poblaciones de *F. graminearum*

*Fusarium graminearum* ha sido aislado de regiones agrícolas distribuidas en todo el mundo, sin embargo poco es lo que se conoce sobre la estructura de las poblaciones del hongo procedentes de distintas áreas geográficas. Dusabenyagasami *et al.* (1999), Carter *et al.* (2000), Walker *et al.* (2001) y Mishra *et al.* (2004) analizaron la diversidad en los genomas de aislamientos de *F. graminearum* provenientes de distintas regiones de Europa, Canadá, Nepal y EE.UU., respectivamente. Encontraron que la diversidad genotípica entre aislamientos de *F. graminearum* es variable: mientras que en EE.UU. y Europa se demostró que la misma es alta (Carter *et al.* 2000; Walker *et al.* 2001); en Canadá se reportaron tanto valores de diversidad bajos (Dusabenyagasami *et al.* 1999) como altos (Mishra *et al.* 2004).

En la República Argentina, Ramírez *et al.* (2006) usaron los VCGs para demostrar que la diversidad genotípica presente en tres poblaciones de *F. graminearum* de la región centro norte de cultivo de trigo es alta. Posteriormente, se analizó mediante marcadores AFLP la estructura genética de dos de estas poblaciones y se confirmó que las mismas tenían altos niveles de diversidad genética (Ramírez *et al.* 2007). Resultados similares fueron obtenidos por Álvarez *et al.* (2010) utilizando 18 aislamientos provenientes de 17 localidades de la Provincia de Buenos Aires.

Aun cuando existen estudios sobre la variabilidad a nivel genético de las poblaciones de *F. graminearum* presentes en la Argentina, las mismas se circunscriben a un área acotada de la región triguera. Considerando la extensión del área cultivada con esta gramínea en el país y la variabilidad de condiciones agroecológicas presentes, resulta de fundamental importancia ampliar el conocimiento sobre la variabilidad del patógeno a un área que incluya esta heterogeneidad de ambientes.

La utilización de marcadores moleculares que exploren otras porciones del genoma, por su parte, eventualmente podría generar información adicional y complementaria a la disponible en la actualidad. En este sentido, se ha comprobado que los ISSR son marcadores moleculares que permiten establecer la relación genética entre aislamientos fúngicos con mayor potencia que otros marcadores como los RAPD o los AFLP (Stenglein y Balatti 2006).

El conocimiento del alcance y la naturaleza de la distribución espacial de la variabilidad genética presente en las poblaciones de *F. graminearum* y su relación con rasgos fenotípicos como la agresividad y la producción de micotoxinas resulta de fundamental importancia para la evaluación del potencial patogénico de las poblaciones de la Argentina, y podría contribuir al desarrollo y mejoramiento de métodos de manejo de la FET más exitosos que los actualmente disponibles (Bowden y Leslie 1997).

En el presente capítulo se buscará poner a prueba la hipótesis de que las poblaciones de *F. graminearum* que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires albergan la misma diversidad a nivel genético. Para ello se plantearon los siguientes objetivos: (i) obtener aislamientos de *F. graminearum* de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires, y (ii) analizar la diversidad genética presente en las poblaciones del patógeno de la Región Pampeana.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Obtención, identificación taxonómica y mantenimiento de los aislamientos**

A partir de muestras de granos de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) procedentes de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires se obtuvieron aislamientos de *F. graminearum* mediante una de dos metodologías: (i) desinfestación de los granos por inmersión en alcohol 70° durante 1 min y en hipoclorito de sodio (0,275 g Cl litro<sup>-1</sup>) durante 1 min, lavado en agua destilada estéril durante 5 min y sembrado en placas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2% (p/v) adicionado con 0,25% (p/v) de Cloranfenicol; y (ii) sembrado de los granos en medio de cultivo APG al 2% (p/v) adicionado con 0,6% (p/v) de pentacloronitrobenceno (PCNB polvo mojable al 75%) y 0,25% (p/v) de Cloranfenicol sin mediar desinfección superficial de los mismos.

La incubación de los granos se realizó a temperaturas de 25°C ± 2°C durante 5 días. Las colonias obtenidas se repicaron a tubos de ensayo con medio APG al 2% (p/v) en pico de flauta y se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de la esporulación de las cepas en medio de cultivo líquido de Capellini y Peterson (Capellini y Peterson 1965) incubado a 25°C en agitación a 45 rev min<sup>-1</sup> por 2 días. El mantenimiento de aislamientos monospóricos se llevó a cabo en viales con aceite mineral y/o con agua destilada estéril a 4°C (Buell y Weston 1947).

La identificación taxonómica de los aislamientos obtenidos se realizó sobre la base de criterios morfológicos y fenotípicos y mediante el uso de marcadores moleculares especie-específicos. Para la identificación morfofisiológica, los aislamientos fueron sembrados en APG al 2% (p/v) y en medio agar clavel (o CLA, acrónimo inglés de Carnation leaf agar), incubados bajo luz fluorescente a 22°C ± 2°C durante 7 a 14 días e identificados de acuerdo con la densidad y pigmentación del

micelio aéreo, la tasa de crecimiento, la producción de peritecios y la ontogenia conídica siguiendo los criterios de Booth (1971), Nelson *et al.* (1983), y Leslie y Summerell (2006).

### 2.2.2. Identificación taxonómica mediante PCR especie-específica

Para la extracción de ADN, los aislamientos provenientes de la colección conformada y mantenida a 4°C en agua/vaselina se sembraron en placas de Petri conteniendo medio de cultivo APG al 2% (p/v) con 0,25% (p/v) de Cloranfenicol. Las placas sembradas fueron incubadas a 25°C ± 2°C durante 7 días y las colonias de *F. graminearum* obtenidas se utilizaron para la extracción de ADN.

El ADN genómico se obtuvo mediante una de dos metodologías: (i) la *mini-prep* desarrollada por Stenglein y Balatti (2006) y modificada para la extracción de ADN de *Fusarium* y (ii) utilizando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Para la extracción del ADN mediante *mini-prep*, 250 mg de micelio provenientes de cultivos monospóricos de *F. graminearum* se colocaron en un microtubo de 1,5 mL, fueron congelados en nitrógeno líquido y molidos con ayuda de un micropistilo. Se agregaron 500 µL de buffer de extracción (1% p/v CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,7 M NaCl, 0,5% de Polivinilpirrolidona (PVP) de peso molecular 40.000 y 10 mM EDTA) y se calentó la mezcla a 60°C durante 30 min. Se añadió un volumen de cloroformo: isoamil alcohol (12: 1 v/v), se mezcló en vortex y se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. La fase acuosa, conteniendo el ADN, fue transferida a un nuevo microtubo, se adicionaron un volumen de isopropanol y 10% de AcNa 3M y se precipitó el material nucleico a -20°C durante la noche. El ADN precipitado se centrifugó a 10.000 g durante 10 minutos, se lavó con etanol 70% y se disolvió en 50 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA pH 8) a 37°C.

Para la extracción de ADN mediante kit comercial, el micelio proveniente de cultivos monospóricos de *F. graminearum* fue congelado en nitrógeno líquido, molido en mortero y 40 mg del polvo obtenido se pasaron a un microtubo de 1,5 mL. Se añadieron 600 µL de solución de lisis nuclear (Promega), se mezcló brevemente en vortex para mojar el tejido, y se incubó a 65°C durante 15 min. Se agregaron 3 µL de solución de RNasa (10 µg/µL; Sigma), se mezcló invirtiendo el tubo, se incubó a 37°C durante 15 min y se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 200 µL de solución de precipitación de proteínas (Promega), se mezcló vigorosamente, se centrifugó durante 3 min a 16.000 g y se recuperó el sobrenadante, conteniendo el ADN, el cual fue transferido a un tubo de 1,5 mL limpio con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16.000 g durante 1 min, se decantó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó añadiendo 600 µL de etanol al 70% y centrifugando a 16.000 g por 1 min. Se secó el pellet y se rehidrató en 100 µL de buffer TE a 37°C.

La cantidad y calidad del ADN extraído se estimaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,7% al que se le adicionaron 0,2 mg mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio (Sambrook *et al.* 2001) a 80V en buffer 1X trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y el tamaño de los mismos se estimó por

comparación con las bandas generadas por el marcador molecular *Lambda* DNA/*Hind III* (Fermentas, USA). El marcador corresponde al ADN del bacteriófago *Lambda* completamente digerido con la endonucleasa *Hind III*, purificado y disuelto en un buffer de almacenado. El marcador contiene 8 fragmentos de entre 125 y 23.000 bp con concentraciones de entre 1,3 y 238,4 ng/ $\mu$ L.

Para la realización de la PCR especie específica se utilizaron el par de primers Fg16NF (5' - ACA GAT GAC AAG ATT CAG CGA CA - 3') y Fg16NR (5' - TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA - 3') de acuerdo con una modificación del procedimiento descrito por Nicholson *et al.* (1998). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 25  $\mu$ L conteniendo 5-20 ng de ADN fúngico. La mezcla de reacción contuvo 200  $\mu$ M de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5  $\mu$ M de cada uno de los primers (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,8 unidades de *Taq* polimerasa (Highway Molecular Biology-InBio-UNICEN-Tandil), 1,5 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ , y 1X buffer de reacción (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100). El termociclador (PTC-150 MiniCycler™- M.J. Research, INC., USA) se programó con una secuencia de ciclos consistentes en: un paso de desnaturalización (95°C) por 3 min, seguido por 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 62°C por 20 s y extensión a 72°C por 45 s, finalizando con un paso de extensión (72°C) durante 5 min. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) conteniendo 0,2 mg.mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio a 80V en buffer 1X Trisborato-EDTA. Los fragmentos de ADN se visualizaron bajo luz UV y el tamaño de los mismos se estimó por comparación con las bandas generadas por un marcador molecular de ADN de 1 kb (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN- Tandil).

### 2.2.3. Variabilidad genética de las poblaciones de *F. graminearum*

Los aislamientos obtenidos y caracterizados como *F. graminearum* fueron estudiados en su variabilidad genética utilizando primers ISSR. Para ello se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando primers de entre 15 y 25 bases constituidos por secuencias de 2 a 4 bases repetidas en tándem con y sin anclaje en los extremos 5' y/o 3'. Se probaron 26 primers ISSR cuyas secuencias de nucleótidos y temperaturas de hibridación se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1** - Primers inter-simple sequence repeats (ISSR) utilizados en el presente trabajo.

Nombre del Primer	Secuencia del Primer (5' a 3')	Temperatura de hibridación (°C)
826	ACC ACA CAC ACA CAC C	55
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	55
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	55
854	TCT CTC TCT CTC TCT CRG	55
AA3	AGA GAG AGA GAG AGA GTA	46
AA5	GAG AAG AAG AAG AAG AAG	48

Tabla 1 –Continuación

Nombre del Primer	Secuencia del Primer (5' a 3')	Temperatura de hibridación (°C)
ABT13	GAC AGA CAG ACA GAC A	48
B	AGA GAG AGA GAG AGA GTG	52
BA3	ACA CAC ACA CAC ACA CCT	48
C	AGA GAG AGA GAG AGA GCG	54
CA5	CAT ACA ACA ACA ACA ACA	48
D	AGA GAG AGA GAG AGA G	49
DA5	ACA ATC ATC ATC ATC ATC	48
E	CTC GTG TGT GTG TGT GTG T	54
EA3	GAG GAG GAG GAG GAG CAG	52
EN	GAC GAC GAC GAC GAC	48
F	CTG AGA GAG AGA GAG AGA	57
FA3	GAG AGA GAG AGA GAG AAC C	48
FA5	TAC GAG AGA GAG AGA GAG A	50
G	GAC CAA CAA CAA CAA CAA	52
GA5	TCA GTG TGT GTG TGT GTG T	48
HA5	CTG CCG CCG CCG CCG CC	65
IA5	ACA CAA CAA CAA CAA CAA	48
J	CAC CAC CAC CAC CAC	55
KA5	CTA CAC ACA CAC ACA CAC	52
LA5	CAG AAC AAC AAC AAC AAC	52

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ L, conteniendo 12-15 ng de ADN genómico, 1X buffer de reacción, 1,25 unidades de *Taq* polimerasa, 0,75  $\mu$ M de primer, 200  $\mu$ M de cada dNTP y 2,5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ . En cada una de las reacciones de amplificación llevadas a cabo se incluyó un control negativo sin ADN.

El programa de amplificación consistió en un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min seguido de 33 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), hibridación a temperaturas entre 48 y 52°C según el primer (1 min 15 seg) y extensión a 72°C (4 min); y un paso de extensión final a 72°C (7 min). Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C. Los productos de reacción se separaron en base a su peso molecular por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) conteniendo 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio en buffer 1X Trisborato-EDTA. Las corridas se realizaron a 90 voltios, los fragmentos de ADN obtenidos se visualizaron bajo luz UV y el tamaño de los mismos fue estimado por comparación con las bandas generadas por un marcador molecular de ADN de 1 kb.

#### 2.2.4. Análisis de agrupamientos

Los geles se visualizaron con el analizador de imágenes GeneGenius (Syngene, USA) utilizando el programa informático GeneSnaps para la toma de fotografías, y los programas informáticos GeneTools y GeneDirectory para el análisis de las mismas.

La información generada por los marcadores ISSR fue almacenada utilizando el programa informático GeneTools (Syngene, USA). El paquete permite almacenar la



información obtenida de las fotografías de los geles mediante GeneSnap y relacionar el tamaño de los fragmentos obtenidos con los de los estándares de peso molecular utilizados. Para la comparación de los patrones de bandas obtenidos en los distintos geles se utilizó el programa informático GeneDirectory (Syngene, USA), que trabaja en forma conjunta con GeneTools y permite estudiar y comparar los patrones de bandas obtenidos en el conjunto de los geles, generando una matriz de similitud entre los distintos tratamientos y permitiendo la confección de fenogramas a partir de la misma.

El análisis de la matriz de similitud se realizó mediante el algoritmo de comparación de grupos de pares de medias aritméticas no ponderadas (o UPGMA, acrónimo inglés de Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Averages). Es una técnica jerárquica porque origina conjuntos que presentan rangos, exclusiva porque los genotipos no pueden pertenecer a más de un grupo en un mismo nivel o rango y secuencial porque los grupos se forman de a uno hasta agotar el conjunto total (Crisci y López Armengol 1983). El procedimiento consiste en el agrupamiento de los genotipos en sucesivos conjuntos (de número menor que el número de genotipos) para llegar finalmente a un solo conjunto que los contiene a todos. La técnica considera que el valor de similitud de la unidad a incorporarse a un grupo o núcleo es igual al promedio de los valores de similitud entre la unidad y cada uno de los integrantes del núcleo, retornando en cada paso a la matriz de similitud original.

La similitud entre los genotipos se analizó aplicando el coeficiente de asociación de Jaccard, según Sneath y Sokal (1973), definido por la fórmula:  $S_{ij} = a/(a+b+c+d)$ , donde  $S_{ij}$  es la similitud entre dos individuos,  $i$  y  $j$ ;  $a$  es el número de bandas presentes en ambos  $i$  y  $j$ ;  $b$  es el número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$ ;  $c$  es el número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ , y  $d$  es el número de bandas ausentes en ambos. Los valores de similitud del coeficiente oscilan entre 1 y 0, que equivalen a la máxima y mínima similitud, respectivamente.

### 2.2.5. Análisis de la Varianza Molecular

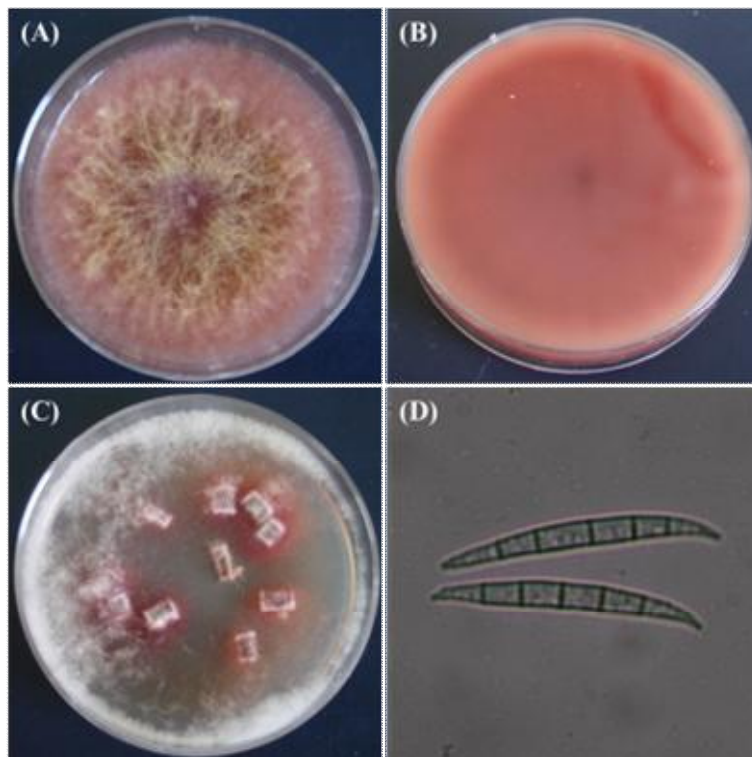
Se empleó el análisis de varianza molecular (o AMOVA, acrónimo inglés de Analysis of Molecular Variance) (Excoffier *et al.* 1992) para particionar la varianza en sus componentes jerárquicos (varianza entre y dentro de las poblaciones de *F. graminearum*) y para probar la significancia de los mismos. El procedimiento se basa en un análisis de varianza clásico que utiliza la distancia entre perfiles de bandas obtenidos mediante la amplificación por PCR o haplotipos. La matriz de distancia se construye empleando el coeficiente de distancia Euclideo equivalente al número de diferencias entre los patrones de amplificación de dos individuos. Para establecer el nivel de significancia de los componentes de la varianza se obtiene el estadístico  $\phi$  mediante permutaciones al azar, siendo la probabilidad de obtener por azar un estadístico mayor que el observado el nivel de significancia estadística (Excoffier *et al.* 1992).

El AMOVA se realizó mediante el programa informático Arlequín v. 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005). Para ello se generó una matriz binaria a partir de los documentos fotográficos de los fragmentos de ADN amplificados y separados por electroforesis. Esta es una matriz  $n \times t$  donde las  $n$  filas representan las bandas y las  $t$  columnas representan los genotipos. Para cada primer se consideró presencia (1) o ausencia (0) de las bandas polimórficas obtenidas.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Aislamiento e identificación taxonómica

Durante las campañas trigueras 2006/07, 2007/08 y 2008/09 se recibieron muestras de trigo pan de 36 localidades de la provincia de Buenos Aires y 2 localidades de la Provincia de Entre Ríos. A partir de estas muestras se obtuvieron 160 aislamientos fúngicos los cuales, sobre la base de sus características morfo-fisiológicas, fueron identificados como pertenecientes a la especie *F. graminearum*.



**Figura 4** - Identificación morfofisiológica de aislamientos de *Fusarium graminearum*. (A) coloración de micelio aéreo; (B) coloración en medio de cultivo agar papa glucosado (APG); (C) Producción de esporodoquios y peritecios en medio de cultivo agar hoja de clavel (CLA); (D) tamaño y forma de macroconidios.

Los aislamientos presentaron las características indicadas por Booth (1971), Nelson *et al.* (1983), y Leslie y Summerell (2006) en sus descripciones de la especie *F. graminearum*. En el medio de cultivo APG los aislamientos crecieron rápidamente, llegando a completar una caja de Petri de 90 mm de diámetro en 7 días o menos. Las colonias presentaron micelio denso con coloraciones blancas, anaranjadas a amarillas y produjeron pigmentos de color rojo en el agar. En medio de cultivo CLA se observó la producción de esporodoquios de coloraciones anaranjadas, conteniendo los macroconidios, y de peritecios de la forma sexual *G. zae* (Figura 4).

La identidad de los aislamientos fue confirmada mediante PCR utilizando el par de primers FG16NF / R desarrollados por Nicholson *et al.* (1998). La especificidad de los primers fue validada mediante su búsqueda en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, utilizando la herramienta de búsqueda de alineamientos (Basic Local Alignment Search Tool –BLAST-). Esta herramienta compara secuencias de nucleótidos o proteínas con las secuencias almacenadas en las bases de datos y calcula la significancia estadística de los alineamientos encontrados.

Utilizando para la búsqueda en el BLAST las secuencias de los primers especie-específicos, se encontró que los mismos se alinearon con una identidad del 99% a la secuencia almacenada en la base de datos del NCBI con número de acceso AY937106.1, identificada como un fragmento de secuencia genómica específica de *G. zeae* cepa 02-11. La secuencia franqueada por los primers *forward* y *reverse* comprende un fragmento de 284 pb (Figura 5).

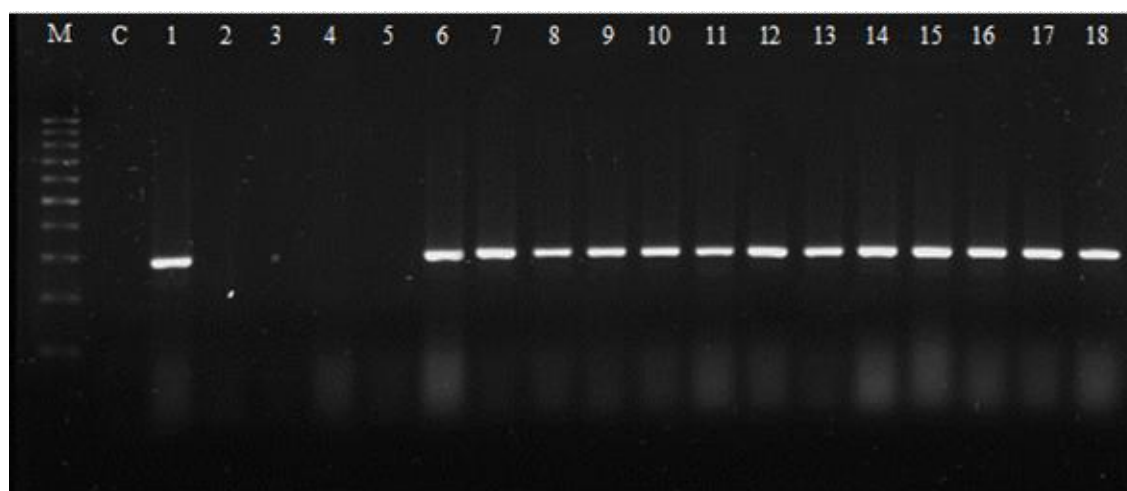
**Fg16NR ->**

```
GTCAATGCTAGTTTCACATCTTCTTTGACATCTGTTCAACCCAGTAAAGCTGTAATAAT
GTAATTATCAATGACACCTTTGTGTATTCTATCGTTCATCGGCAGCATACTATGAGGGT
CTGTTGCATTATCCTTTGTACTTGAAAAATCTCCTTTATAACTTGTTCATATGATACCTT
CCGCTTCCAGGAGTTGAAAGCACAGTCGAACATCATACTATATACCATTGCATTACCT
ACCTAGGTAGGTATCCGACATGGCAAACCTTATAAGTGCAGTTATATGTGCCTGAATCTT
GTCATCTGTTTCCACCTGCAGCAACCTTAACCGACTATTCTACACTGCTATTATC
```

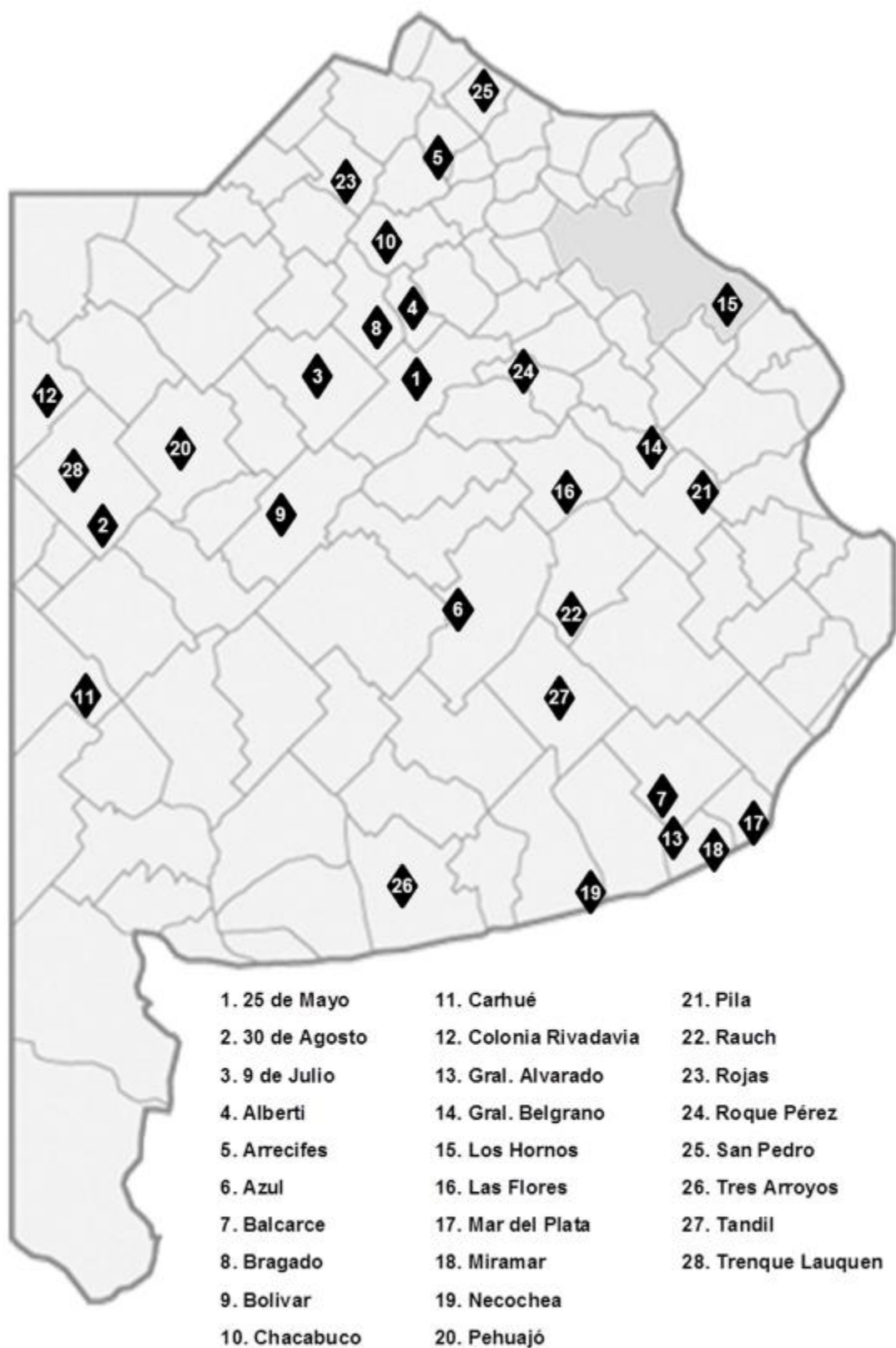
**<-Fg16NF**

**Figura 5** - Fragmento de 284 pb. perteneciente al acceso AY937106.1 del National Center for Biotechnology Information (NCBI), identificado como un fragmento de secuencia genómica específica de *Gibberella zeae* cepa 02-11. Los primers especie-específicos FG16N F / R se alinearon con una identidad del 99% a la secuencia almacenada de acuerdo con la herramienta de búsqueda de alineamientos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

La especificidad de la reacción de amplificación fue evaluada utilizando como controles cepas provenientes de la colección del Royal Botanical Garden de Australia, las cuales fueron gentilmente cedidas por el Dr. Bret Summerell (Figura 6). Se utilizó como control positivo una cepa de *F. graminearum* (RBG2507) y como controles negativos un aislamiento de *F. pseudogramineum* (RBG5339), y otras especies de *Fusarium* relacionadas con la FET: *F. culmorum* (RBG997), *F. crookwellense* (RBG999), y *F. sambucinum* (RBG1413).



**Figura 6** - Especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los primers FG16NF / R para la identificación de aislamientos de *Fusarium graminearum*. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1.000 pb., la C al control sin ADN, la 1 al control positivo de *F. graminearum* (RBG 2507), las 2 – 5 a los controles negativos de *F. culmorum* (RBG997), *F. crookwellense* (RBG999), *F. pseudogramineum* (RBG5339), y *F. sambucinum* (RBG1413), respectivamente y las 6 – 18 a aislamientos fúngicos provenientes de muestras de trigo de la Provincia de Buenos Aires afectadas por la Fusariosis de la Espiga (FET).



**Figura 7** - Mapa de la Provincia de Buenos Aires mostrando los sitios de procedencia de los aislamientos de *Fusarium graminearum* incluidos en el presente trabajo.

**Tabla 2** - Aislamientos de *Fusarium graminearum* incluidos en el presente trabajo

<b>Aislamiento</b>	<b>Localidad<sup>a</sup></b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Localidad<sup>a</sup></b>
25M1	25 de Mayo	LH7	Los Hornos
30A3	30 de Agosto	LH8	Los Hornos
9J1	9 de Julio	LH9	Los Hornos
A2	Alberti	LH11	Los Hornos
A4	Alberti	LH12	Los Hornos
A5	Alberti	MP1	Mar del Plata
A6	Alberti	MP2	Mar del Plata
AR1	Arrecifes	MR1	Miramar
AZ1	Azul	MR2	Miramar
BA1	Balcarce	MR3	Miramar
BA2	Balcarce	MR4	Miramar
BA3	Balcarce	MR5	Miramar
BA4	Balcarce	MR7	Miramar
BA5	Balcarce	MR9	Miramar
BA6	Balcarce	MR12	Miramar
BA8	Balcarce	MR13	Miramar
BA9	Balcarce	MR14	Miramar
BA10	Balcarce	MR15	Miramar
BA11	Balcarce	MR16	Miramar
BA12	Balcarce	MR18	Miramar
BA13	Balcarce	MR19	Miramar
BA14	Balcarce	MR21	Miramar
BA15	Balcarce	MR22	Miramar
BR1	Bragado	MR23	Miramar
BV1	Bolívar	MR24	Miramar
CH1	Chacabuco	MR25	Miramar
CH2	Chacabuco	MR26	Miramar
CR2	Carhué	MR28	Miramar
CRV1	Colonia Rivadavia	MR29	Miramar
GA1	Gral. Alvarado	MR30	Miramar
GA2	Gral. Alvarado	MR31	Miramar
GB1	Gral. Belgrano	MR32	Miramar
GB2	Gral. Belgrano	MR33	Miramar
GB3	Gral. Belgrano	MR35	Miramar
GB4	Gral. Belgrano	MR36	Miramar
IV II 3	Los Hornos	MR37	Miramar
LF1	Las Flores	MR38	Miramar
LF2	Las Flores	MR39	Miramar
LF3	Las Flores	MR40	Miramar
LH1	Los Hornos	MR41	Miramar
LH2	Los Hornos	MR42	Miramar
LH4	Los Hornos	MR43	Miramar
LH5	Los Hornos	MR45	Miramar
LH6	Los Hornos	MR46	Miramar

**Tabla 2** – Continuación.

<b>Aislamiento</b>	<b>Localidad<sup>a</sup></b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Localidad<sup>a</sup></b>
MR48	Miramar	RJ5	Rojas
N1	Necochea	RP1	Roque Pérez
N2	Necochea	RP2	Roque Pérez
N3	Necochea	RP4	Roque Pérez
PH1	Pehuajó	SP1	San Pedro
PL1	Pila	SP2	San Pedro
PL2	Pila	SP3	San Pedro
PL4	Pila	TA1	Tres Arroyos
R1	Rauch	TD1	Tandil
R2	Rauch	TL2	Trenque Lauquen
R3	Rauch	TL3	Trenque Lauquen
R4	Rauch	TL4	Trenque Lauquen

<sup>a</sup> = localidad de origen de la muestra de trigo utilizada para el aislamiento

Ciento veintitrés aislamientos provenientes de la provincia de Buenos Aires identificados como *F. graminearum* de acuerdo con su morfofisiología fueron analizados mediante PCR especie-específica. La amplificación de una banda de 280 pb a partir del ADN molde de 112 de estos aislamientos confirmó su identificación como pertenecientes a esta especie. Estos aislamientos fueron utilizados posteriormente en las pruebas de variabilidad genética, agresividad y producción de micotoxinas (Figura 7 y Tabla 2).

### 2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa con primers inter-simple sequence repeats

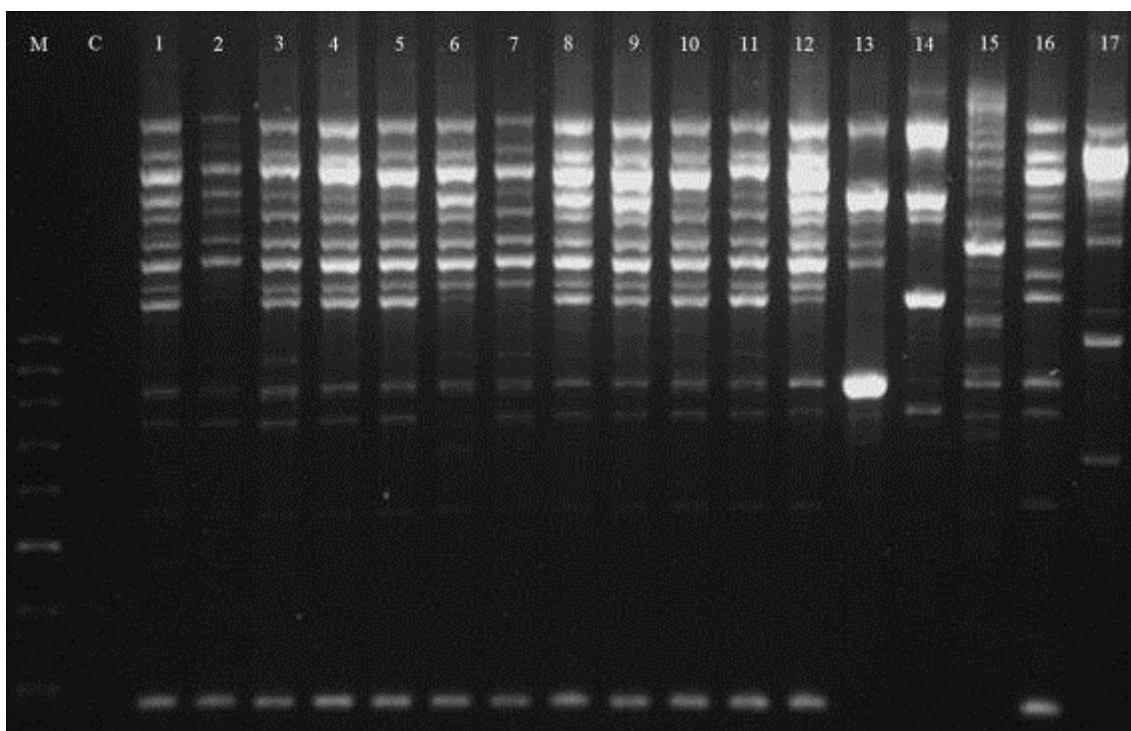
Se realizaron reacciones de PCR con un set de 26 primers ISSR. De estos, solo 4 generaron bandas polimórficas que fueron utilizadas para realizar los análisis de diversidad genotípica de los aislamientos de *F. graminearum* (Tabla 3).

**Tabla 3** - Primers inter-simple sequence repeats (ISSR) polimórficos utilizados en los análisis de variabilidad genética mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

<b>Nombre del Primer</b>	<b>Secuencia del Primer (5' a 3')</b>	<b>Temperatura de hibridación (°C)</b>
BA3	ACA CAC ACA CAC ACA CCT	48
FA5	TAC GAG AGA GAG AGA GAG A	50
KA5	CTA CAC ACA CAC ACA CAC	52
LA5	CAG AAC AAC AAC AAC AAC	52

Los cuatro primers polimórficos estaban anclados: 2 en el extremo 5' (FA5 y LA5) y 2 en el extremo 3' (BA3 y KA5). Con excepción del primer LA5, con secuencia de tri-nucleótidos, el resto de los primers contenían motivos de dinucleótidos repetidos en tándem con la particularidad de que los primers BA3 y KA5 presentaron los mismos di-nucleótidos repetidos (AC) y solo se diferenciaron por la secuencia y ubicación de sus anclajes (Tabla 3).

Con estos 4 primers ISSR, se amplificaron un total de 80 fragmentos de ADN a partir de 117 aislamientos del género *Fusarium*, de los cuales 69 (86%) resultaron polimórficos. En la Figura 8 se presentan ejemplos de los patrones de bandas amplificadas por algunos de los oligonucleótidos utilizados como primer.

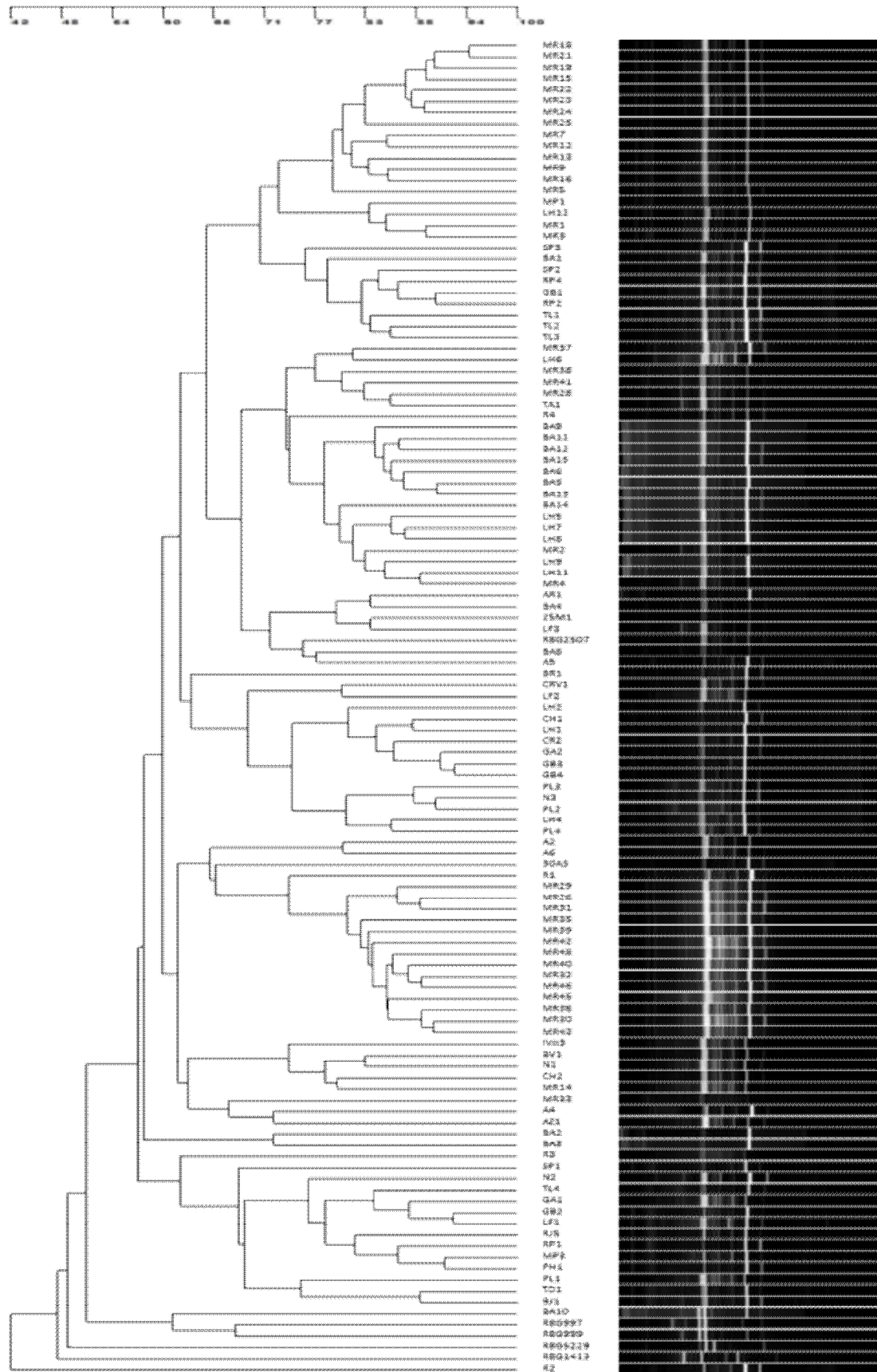


**Figura 8** - Ejemplo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers inter-simple sequence repeats (ISSR). La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1000 pb, la C al control sin ADN, las 1 - 12 a aislamientos de *Fusarium graminearum* obtenidos en el presente trabajo, la 16 al control positivo de *F. graminearum* (RBG 2507) y las 13, 14, 15 y 17 a los aislamientos de *F. culmorum* (RBG997), *F. crookwellense* (RBG999), *F. pseudograminearum* (RBG5339), y *F. sambucinum* (RBG1413), respectivamente.

El análisis de agrupamientos de la información obtenida mediante los 4 primers ISSR permitió la diferenciación de 117 haplotipos. De estos, 112 se correspondieron con los aislamientos de *F. graminearum* examinados. Los 5 haplotipos restantes correspondieron a los controles de *F. graminearum* (cepa RBG2507), *F. culmorum* (cepa RBG997), *F. crookwellense* (cepa RBG999), *F. pseudograminearum* (cepa RBG5339), y *F. sambucinum* (cepa RBG1413), obtenidos de una colección internacional.

Con la información obtenida con los 4 primers polimórficos se confeccionó un fenograma (Figura 9). Todos los aislamientos de *F. graminearum* se ubicaron en un grupo con un porcentaje de similitud del 65%. El aislamiento de *F. graminearum* utilizado como control positivo se ubicó entremedio de los aislamientos argentinos, mientras que los aislamientos pertenecientes a otras especies de *Fusarium*, junto con 2 de los aislamientos de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires (R2 de Rojas y BA10 de Balcarce), se ubicaron en un grupo separado con un coeficiente de similitud de alrededor del 50%.





**Figura 9** - Fenograma obtenido a partir de los patrones de bandas generados por 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* con 4 primers inter-simple sequence repeats (ISSR) polimórficos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



En el fenograma obtenido puede observarse la presencia de grupos de aislamientos que se organizaron con niveles de similitud cercanos al 75%. Los aislamientos de Miramar, que constituyeron el grupo de individuos más numerosos provenientes de un mismo sitio, se agruparon casi exclusivamente en dos grandes grupos cada uno de los cuales incluyó a 14 individuos. Resultados similares se observaron en el análisis de los aislamientos de Balcarce que se constituyó en la segunda localidad con mayor número de aislamientos analizados.

Aproximadamente la mitad de los individuos de Balcarce (7 aislamientos) se agruparon mayoritariamente en un grupo común con un nivel de similitud cercano al 80%. El resto de los aislamientos, procedentes de localidades menos representadas en cuanto al número de individuos, se agruparon en grupos menores que incluyeron aislamientos de diversos orígenes, si bien un análisis general sugiere que los mismos se agruparon en base a la localidad de procedencia.

El resultado del AMOVA (índice de fijación de diferenciación entre poblaciones  $\phi = 0,10$ ,  $p < 0,001$ ) indicó que la mayor parte de la variación encontrada se debió a diferencias genéticas entre individuos de la misma población (89%). Las diferencias entre individuos de distintas poblaciones, por su parte, fueron responsables de una menor proporción de la variabilidad total (11%) (Tabla 4).

**Tabla 4** - Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* a partir de la información obtenida con 4 primers inter-simple sequence repeats (ISSR) polimórficos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la varianza
Entre poblaciones	27	84,668	0,26315**	11%
Dentro de las poblaciones	84	185,519	2,20857**	89%
Total	111	270,188	2,47171	

\*\* = significativo a  $P = 0,01$

## **2.4. DISCUSIÓN**

A través del análisis de secuencias específicas de ADN genómico de aislamientos provenientes de distintas partes del mundo, O'Donnell *et al.* (2000) dividieron a *F. graminearum* en 7 linajes estructurados biogeográficamente. Posteriormente, a éstos y otros linajes se les asignó el taxón de especie (O'Donnell *et al.* 2004). Actualmente, al menos 13 especies conformarían el complejo de *F. graminearum* (O'Donnell *et al.* 2004; Starkey *et al.* 2007; O'Donnell *et al.* 2008; Yli-Mattila *et al.* 2009). A pesar de que estas especies se encuentran ampliamente caracterizadas, existe un número importante de antecedentes bibliográficos que rechazan esta división.

En el pasado, las barreras reproductivas han sido utilizadas en la delimitación de las especies. En este sentido, la demostración de la posibilidad de cruzamiento de individuos pertenecientes al linaje 7 de *F. graminearum* con otros de los restantes

linajes (Bowden *et al.* 2006) cuestionaría la validez de la designación del concepto de especie a los linajes inter-fértiles.

Otros aspectos relacionados con la capacidad patogénica de las distintas especies que conformarían el complejo de *F. graminearum* y que se relacionan específicamente con los aspectos fitopatológicos asociados a la inducción de los síntomas de la FET han sido a su vez investigados. En este sentido, Cumagun *et al.* (2004) identificaron los loci asociados con la patogenicidad y la agresividad en el mapa genético de una cruce entre un aislamiento, productor de NIV, perteneciente al linaje 6 y otro, productor de DON, del linaje 7. Entre la progenie obtenida, la agresividad frente al trigo varió cuantitativamente y no se detectó segregación transgresiva para este carácter, motivo por el cual los autores sugirieron que sólo unos pocos loci asociados con la agresividad diferirían entre estos linajes. Goswami y Kistler (2005), por su parte, probaron 31 cepas pertenecientes a 8 especies del complejo *F. graminearum* buscando diferencias en su agresividad y producción de micotoxinas. Los autores hallaron la presencia de altos niveles de variabilidad para ambos caracteres; sin embargo, ésta resultó ser específica de cada cepa y no de cada especie.

Estos antecedentes y la inclinación eminentemente fitopatológica que se ha buscado imprimir al presente trabajo justifican que en el mismo la identificación taxonómica de los aislamientos obtenidos fuera llevada adelante exclusivamente hasta el nivel de pertenencia al complejo de especies (*F. graminearum sensu lato* o en sentido amplio).

Ciento veintitrés aislamientos obtenidos de 36 localidades de la Provincia de Buenos Aires durante tres campañas trigueras fueron caracterizados como *F. graminearum* de acuerdo con su morfo-fisiología. Un análisis posterior en base a la amplificación de un fragmento específico del genoma de *F. graminearum* de 280 bp confirmó que 112 de ellos, obtenidos de 28 localidades, pertenecieron a la especie *F. graminearum*.

Debido a la naturaleza esporádica de los ataques de FET y a su dependencia de factores ambientales, el número de aislamientos de *F. graminearum* obtenidos no resultó homogéneo entre las distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires. En consecuencia, mientras algunas de las localidades muestreadas se encontraron escasamente representadas, otras como Miramar o Balcarce fueron analizadas en base a un mayor número de individuos.

La variabilidad genotípica presente en los 112 aislamientos de *F. graminearum* fue evaluada mediante marcadores moleculares ISSR. Con este fin, se seleccionaron a partir de un set de 26 oligonucleótidos, 4 primers ISSR que produjeron un 86% de fragmentos polimórficos. Aún este número limitado de primers condujo a la identificación de haplotipos distintos y específicos a cada uno de los aislamientos. Similares niveles de variabilidad genética han sido reportados para los marcadores moleculares ISSR en el análisis de poblaciones de hongos fitopatógenos (Stenglein y Balatti 2006; Stodart *et al.* 2007; Moreno *et al.* 2008; Lurá *et al.* 2011) así como de especies del género *Fusarium* (Dubey y Singh 2008; Bayraktar y Dolar 2011; Mishra *et al.* 2006), incluyendo a *F. graminearum* (Mishra *et al.* 2004) y a especies relacionadas del género causantes de la FET (Mishra *et al.* 2003; Dinolfo *et al.* 2010).

Los porcentajes de similitud entre los aislamientos más estrechamente relacionados y los más distantes fueron de 94% y 65%, respectivamente, sugiriendo una alta heterogeneidad en las poblaciones de *F. graminearum* analizadas. Los aislamientos de las especies de *Fusarium* relacionadas con la FET se ubicaron por fuera de los grupos que incluyeron los aislamientos de *F. graminearum*, con los que mostraron porcentajes de similitud de alrededor del 50%. Dos de los aislamientos de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires (el aislamiento R2 de Rojas y el aislamiento BA10 de Balcarce) se ubicaron dentro de este grupo. Esto pudo deberse a que no se obtuvieron patrones de amplificación con los primers KA5 y LA5 con el ADN molde de los aislamientos R2 y BA10, respectivamente.

*Fusarium graminearum* es un hongo homotálico, por lo tanto es capaz de producir como consecuencia de la reproducción sexual ascocarpos tanto homocigotas, producto de autofecundaciones, como heterocigotas, producto de cruzamientos (Miedaner *et al.* 2001). Bowden y Leslie (1999) reportaron una alta tasa de cruzamientos entre aislamientos de *F. graminearum* en condiciones de laboratorio. A pesar de que no existe evidencia de que los eventos de recombinación sexual ocurran en forma natural, una posible explicación para la alta variabilidad genética encontrada en el presente trabajo sería la ocurrencia de eventos de reproducción sexual en las poblaciones del patógeno de la Argentina.

Si bien son escasos los estudios previos en relación a la diversidad genética de los aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina, éstos han mostrado resultados similares. Estos estudios previos se han circunscrito a pequeñas áreas de la región triguera argentina (Ramírez *et al.* 2006; Ramírez *et al.* 2007) o un número limitado de aislamientos dentro de áreas de cultivo más amplias (Álvarez *et al.* 2010). Ramírez *et al.* (2006) usaron los VCGs para demostrar que la diversidad genotípica presente en tres poblaciones de *F. graminearum* de la región centro norte de cultivo de trigo es alta. Posteriormente, Ramírez *et al.* (2007) caracterizaron con marcadores moleculares AFLP la estructura genética de dos de estas poblaciones. Los autores encontraron que el nivel de diversidad genética presente es alto, con un importante desequilibrio de ligamiento, concluyendo que las poblaciones muestreadas son parte de una población mayor que incluye probablemente a toda la región central norte de la Argentina.

Entre los aislamientos analizados en el presente trabajo, se observó que algunos se agruparon con índices de similitud de entre 75% y 80%. Los aislamientos que se ubicaron dentro de estos clústeres provinieron con frecuencia de una única localidad, lo que sugiere que los mismos se organizaron al menos parcialmente en base al sitio de origen. Así, por ejemplo, los aislamientos provenientes de Miramar, la localidad más ampliamente representada entre las muestreadas, se organizaron en forma casi exclusiva en dos grupos. Una organización similar se verificó para los aislamientos provenientes de muestras de Balcarce, la segunda localidad más representada, los cuales se organizaron mayormente en otro de los clústeres. Mishra *et al.* (2004) encontraron similares niveles de agregación y han sugerido que el impacto parcial del origen geográfico de los aislamientos en su estructuración podría ser el reflejo de factores como las prácticas agronómicas y/o condiciones ecológicas prevalecientes en las áreas de procedencia de los mismos.

Los resultados del AMOVA, por su parte, sugirieron que la mayor variabilidad genética en los patrones de bandas generados por marcadores moleculares ISSR resultó

de diferencias entre aislamientos pertenecientes a la misma localidad. El análisis mostró que el 89% de la varianza molecular observada en los aislamientos de *F. graminearum* se debe a la variabilidad dentro de las poblaciones, mientras que la variabilidad entre las poblaciones fue baja y correspondió al 11% del total. Estos resultados desmienten la estructuración observada entre los aislamientos en el análisis gráfico producto del fenograma obtenido y se encuentran en concordancia con reportes previos de estimaciones de diversidad genética de las poblaciones de *F. graminearum* de distintas partes del mundo (Dusabenyagasani *et al.* 1999; Gale *et al.* 2002; Miedaner *et al.* 2001; Mishra *et al.* 2004). Miedaner *et al.* (2001) no encontraron evidencias de estructuración geográfica en 200 aislamientos recolectados de distintas regiones mundiales.

El presente trabajo implica una intensificación en la identificación de la variabilidad genética en las poblaciones de *F. graminearum* de la Argentina sobre la base de un gran número de aislamientos pertenecientes a un número importante de poblaciones del patógeno provenientes de diversas zonas de cultivo de la Provincia de Buenos Aires. Más aun, constituye la primera estimación de la diversidad genética presente en las poblaciones del patógeno de la Argentina. Sin embargo, considerando las dificultades en el muestreo y la obtención de los aislamientos, se debe ser prudente al dimensionar el real alcance de la estructuración geográfica identificada en la variabilidad genética de los aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina. Para dilucidar esta problemática, es necesario desarrollar proyectos que abarquen un mayor número de aislamientos procedentes de poblaciones con características agroecológicas contrastantes, que permitan comprobar el rol de las prácticas agronómicas y las condiciones ecológicas prevalecientes sobre la estructuración geográfica de las poblaciones.

## **2.5. CONCLUSIONES**

La diversidad genética presente en las poblaciones de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires es alta y está organizada, al menos parcialmente, en base al sitio de origen. Sin embargo, los resultados del AMOVA mostraron que la mayor variabilidad genética resultó de diferencias entre aislamientos pertenecientes a la misma localidad.

Las dificultades encontradas en el muestreo y la obtención de los aislamientos podrían haber entorpecido la determinación del real alcance de la estructuración geográfica en la variabilidad genética de los aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina.

En el próximo capítulo se analizará la variabilidad en la agresividad que presentan los aislamientos de *F. graminearum* cuya obtención y caracterización genética han sido abordadas en el presente apartado.

## CAPÍTULO III

### VARIABILIDAD EN LA AGRESIVIDAD DE AISLAMIENTOS DE *F. GRAMINEARUM* DE LA ARGENTINA DETERMINADA MEDIANTE INOCULACIÓN PUNTUAL DE ESPIGAS DE PLANTAS DE TRIGO CULTIVADAS A CAMPO

---

**Publicado en:** I. Malbrán, C.A. Mourellos, J.R. Girotti, M.B. Aulicino, P.A. Balatti, y G.A. Lori. 2012. Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. Crop Protection 42: 234–243



## CAPÍTULO III

### **Variabilidad en la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* de la argentina determinada mediante inoculación puntual de espigas de plantas de trigo cultivadas a campo**

#### **3.1. INTRODUCCIÓN**

El entendimiento de las causas y los mecanismos por los cuales los patógenos dañan a sus hospedantes es un tema central en la fitopatología y es de fundamental importancia en el contexto de la producción vegetal (Pariaud *et al.* 2009). La mayor parte de los estudios sobre los aspectos cuantitativos de la interacción patógeno-hospedante hace referencia a la agresividad de los organismos patogénicos. Ésta es entendida como la variación cuantitativa de su patogenicidad sobre hospedantes susceptibles (Pariaud *et al.* 2009) y puede ser estimada por la cantidad de enfermedad inducida por un aislamiento virulento a un hospedante susceptible (Van der Plank 1968).

La interacción entre los aislamientos de *F. graminearum* y la planta de trigo es un fenómeno complejo, que incluye la existencia de variabilidad en la agresividad de las poblaciones del patógeno y la presencia de distintos comportamientos del cereal frente a la FET.

#### **3.1.1. Evaluación de la respuesta a la infección por *F. graminearum* en ensayos de patogenicidad**

La rapidez y simpleza en la determinación que provee la observación visual de la infección de la espiga de trigo ha hecho que esta determinación sea la de mayor utilización en la evaluación de la respuesta al ataque de la FET. Cinco tipos de comportamiento han sido identificados en los genotipos de trigo frente a *F. graminearum*. Estos se organizan de acuerdo con los componentes de la resistencia que entran en juego de la siguiente manera: (I) resistencia a la infección inicial; (II) resistencia a la expansión del patógeno en la espiga; (III) resistencia a la infección del grano; (IV) tolerancia a la infección y (V) resistencia a la acumulación de DON (Mesterházy 2002). Dentro de estas fuentes de resistencia, las más importantes son la resistencia a la infección y/o penetración del patógeno (tipo I) y la resistencia a la expansión de la enfermedad en la espiga (tipo II); ambas descritas por primera vez por Schroeder y Christensen (1963).

Distintos métodos de inoculación que permiten reconocer el efecto de las dos principales fuentes de resistencia han sido desarrollados para la evaluación de materiales en los programas de mejoramiento varietal. Estos ensayos requieren de la inoculación artificial de espigas o plántulas de trigo con alguna estructura del patógeno que presente la capacidad de generar la infección en el vegetal. A pesar de que *F. graminearum* es capaz de producir distintas estructuras vegetativas (micelio), reproductivas (macroconidios y peritecios conteniendo ascosporas en ascas) y de resistencia (clamidosporas) capaces de infectar al trigo (Booth 1971), la producción de inóculo para ensayos de patogenicidad ha estado enfocada fundamentalmente a la utilización de macroconidios debido a su mayor facilidad de producción y a las características hidrofílicas de los mismos. Los volúmenes utilizados para la inoculación

así como la concentración del inóculo utilizada pueden variar considerablemente entre autores (Bai *et al.* 2001; Bai y Shaner 1996; Mesterházy 1981; Mesterházy *et al.* 1999).

El análisis de la respuesta a la infección por aislamientos de *F. graminearum* ha sido habitualmente conducido en ensayos sobre plántulas en invernáculos. Sin embargo, la asociación existente entre este tipo de pruebas y las reacciones de los genotipos de trigo a la FET en condiciones de campo ha sido como máximo tenue (Dill-Macky 2003). Es por esto que el estudio de la respuesta de plantas adultas al ataque de *F. graminearum*, ya sea bajo condiciones naturales o en invernáculo, provee de los mejores resultados para el análisis de la interacción patógeno-hospedante. La aspersión de las espigas del trigo con suspensiones de conidios de *F. graminearum* permite la evaluación de la resistencia tipo I, mientras que la inoculación de las esporas dentro de sólo algunas espiguillas de cada espiga (inoculación puntual) permite evaluar tanto la severidad de la enfermedad inducida (Bai *et al.* 2001) como la expansión de la enfermedad en las espigas (tipo II) (Bai y Shaner 1994).

Estudios histológicos de la expansión del patógeno en las espiguillas proveyeron evidencia de que la ruta de colonización sigue el tejido vascular y que el crecimiento de *F. graminearum* ocurre a mayor velocidad en la dirección longitudinal más que en la transversal (Ribichich *et al.* 2000). La determinación de la capacidad de expansión de los síntomas de la FET en las espigas constituye el estimador más exacto del efecto de la enfermedad (Schroeder y Christensen 1963; Bai y Shaner 1996) debido a que ésta se reconoce como el principal componente de la agresividad del patógeno (Dusabenyagasani *et al.* 1999). Es por ello que la inoculación mediante la inyección del inóculo en espiguillas individuales, que permite el seguimiento de la expansión de los síntomas de la enfermedad en la espiga, es la metodología que provee de datos más fehacientes. Sin embargo, la cantidad de trabajo necesaria para la inoculación conspira contra su uso generalizado y se la reserva casi exclusivamente para el estudio de pequeños números de tratamientos en condiciones de ensayo controladas (Dill-Macky 2003).

Luego de realizada la inoculación, las evaluaciones visuales de la severidad de infección son generalmente llevadas a cabo con anterioridad a la madurez de la espiga para evitar el enmascaramiento de los síntomas de la FET por la senescencia natural de los tejidos (Dill-Macky 2003). El estimador más habitualmente utilizado es la proporción de espiguillas sintomáticas en las espigas de trigo inoculadas, que puede ser determinada contando el número de espiguillas afectadas de entre el total de las espiguillas o ser estimada visualmente como porcentaje teniendo en cuenta el tamaño de la espiga. En este sentido, Stack y McMullen (1995) desarrollaron una escala de diez categorías para la estimación visual del porcentaje de espiguillas infectadas en una espiga, según la cual la presencia de una espiguilla sintomática por espiga resulta equivalente a un 7% de ataque.

Sin embargo, las determinaciones visuales del grado de ataque de la FET pueden resultar en algunos casos confusas. Schroeder y Christensen (1963) propusieron que el taponamiento vascular del raquis por encima del punto de inoculación de las espiguillas infectadas debido a la presencia de *F. graminearum* causaría el desecamiento prematuro de las espigas. Como consecuencia, mientras que los granos desarrollados en las espiguillas ubicadas por debajo de aquéllas que presentan síntomas resultan usualmente normales en color, tamaño, calidad y cantidad, los granos no infectados que se desarrollan sobre las espiguillas infectadas pueden presentarse chuzos y reducidos en



peso, debido a la menor disponibilidad de agua y nutrientes, pero no presentan signos del patógeno.

Determinaciones del alcance del ataque de *F. graminearum* pueden ser también llevadas a cabo luego de la cosecha de las espigas inoculadas considerando el daño ocasionado a los granos. Éste puede ser estimado a partir de la disminución ocasionada en el rendimiento, en el peso de mil granos (PMG) o en el peso hectolítrico (PH) de las parcelas afectadas.

Las disminuciones en el rendimiento son indicadoras del comportamiento varietal frente a la FET y son utilizadas fundamentalmente para la comparación entre líneas en programas de mejoramiento varietal y en el análisis de los efectos de los fungicidas sobre el desarrollo de la enfermedad (Parry 1995).

Las pérdidas en el PH ocurren debido a la deformación de los granos de trigo como consecuencia del ataque de *F. graminearum* (Trigo-Stockli *et al.* 1998). La disminución de este parámetro resulta generalmente concomitante con la caída en el rendimiento como consecuencia de la FET, sin embargo, las pérdidas ocasionadas por la enfermedad sobre el PH son de utilidad cuando el tamaño de la parcela a evaluar es insuficiente para la adecuada determinación del rendimiento (Dill-Macky 2003).

El PMG es un determinante de la calidad del grano que puede ser utilizado en la estimación del daño ocasionado por la FET. Los granos desarrollados en espiguillas infectadas presentan, junto con los síntomas del ataque de la FET, menores densidades y tamaño que redundan en disminuciones del PMG con respecto a los desarrollados en espiguillas sanas. Schroeder y Christensen (1963) determinaron la severidad del ataque de la FET contando el número de espiguillas infectadas por espiga y hallaron una correlación directa entre este valor y el porcentaje de granos afectados por la enfermedad evaluado con posterioridad a la cosecha. La estimación de la disminución del PMG como consecuencia del ataque de *F. graminearum* resulta esencial cuando se pretende evaluar los mecanismos de resistencia del trigo a la FET que limitan el número de granos afectados por el patógeno o la acumulación de micotoxinas en los mismos (Dill-Macky 2003).

En cualquier caso, la determinación precisa de la dinámica de la interacción entre la planta de trigo y *F. graminearum* requiere del conocimiento de la agresividad de los aislamientos a ser utilizados en los ensayos de evaluación, así como el estudio de la estructuración de esta agresividad en las poblaciones del patógeno.

### **3.1.2. Variabilidad en la agresividad de poblaciones de *F. graminearum***

La agresividad de un patógeno es usualmente separada en rasgos cuantitativos elementales de su ciclo de vida y es estimada a través de la severidad de la enfermedad (Gilbert *et al.* 2002), la cual es una variable compuesta resultante del efecto integrado de:

- (i) la eficiencia de la infección, definida como la probabilidad de que una espora depositada en una superficie receptiva del hospedante produzca una lesión en ausencia de interacciones; y
- (ii) el tamaño de la lesión, que se define como la superficie capaz de producir esporas (Pariaud *et al.* 2009).

En uno de los primeros trabajos sobre la variabilidad en la agresividad de los patógenos causantes de la FET, Tu (1930) indicó la existencia de distintas formas fisiológicas en especies de *Fusarium* aisladas de espigas sintomáticas. Sobre la base de las reacciones variables ocasionadas en distintos cultivares de los hospedantes ensayados, se identificaron tres formas fisiológicas en *F. graminearum* y *F. culmorum* y una en *F. avenaceum*. Posteriormente, Purss (1971) reveló que la especialización fisiológica observada por Tu en *F. graminearum* era debida, en realidad, a la existencia de diferencias en la agresividad entre los aislamientos del patógeno. Sobre la base de ensayos de resistencia varietal a distintas especies de *Fusarium*, Mesterházy (1981) concluyó que la resistencia presente en algunos cultivares de trigo a *F. graminearum* es horizontal y no resulta específica de los aislamientos utilizados.

Numerosos estudios indican que existiría amplia variabilidad en la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de muestreos en distintas escalas espaciales: diferentes partes del mundo (Bai y Shaner 1996; Miedaner *et al.* 2001), países o regiones dentro de estos (Dusabenyagasani *et al.* 1999; Walker *et al.* 2001) e incluso lotes de producción (Miedaner y Schilling 1996).

Utilizando la progenie de una cruce entre dos aislamientos de *F. graminearum*, Cumagun y Miedaner (2004) encontraron diferencias significativas en la agresividad y la producción de DON de los 153 genotipos utilizados, aun cuando los progenitores difirieron escasamente en estos caracteres. Resultados similares fueron obtenidos por Xu y Fang (1982), quienes hallaron una marcada diferencia en la agresividad de aislamientos provenientes de ascosporas de *F. graminearum*, incluso cuando éstas fueron obtenidas a partir de las mismas ascas.

La mayor parte de estos trabajos fueron conducidos bajo condiciones de invernáculo. Es por ello que la información respecto de la agresividad de los aislamientos bajo condiciones de campo es escasa y, en aquellos casos en que ha sido estudiada, los investigadores usualmente han optado por realizar la inoculación mediante la aspersión de una suspensión de conidios en lugar de mediante el depósito de las esporas dentro de sólo algunas espiguillas de cada espiga (inoculación puntual).

Si bien la variabilidad en la agresividad presente en los aislamientos de *F. graminearum* ha sido demostrada en distintas áreas del mundo, los estudios realizados en las poblaciones naturales de los campos de la Argentina son escasos. Álvarez *et al.* (2010) encontraron que 18 aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de 17 localidades del área de producción triguera argentina presentaron variabilidad en la agresividad en condiciones de invernáculo. Los autores reportaron que la estimación visual de la severidad de la enfermedad resultó altamente variable y que no reflejó las disminuciones halladas en el peso de los granos.

La resistencia a la FET disponible en los cultivares de trigo argentinos es parcial. No existen cultivares completamente resistentes a la enfermedad aunque Milisich *et al.* (2012) encontraron algunos genotipos que presentaron valores de incidencia y severidad de la FET bajas en ensayos de campo bajo condiciones de infección natural. El conocimiento de la variabilidad de la agresividad de las poblaciones de *F. graminearum* de la Argentina es información básica e indispensable para búsqueda de genotipos de trigo resistentes a la FET. El estudio de la estructuración de la agresividad en las poblaciones del patógeno, por su parte, resulta de fundamental importancia para estimar la durabilidad de la resistencia obtenida por los programas de mejoramiento (Miedaner y Schilling 1996).

En el presente capítulo se pondrá a prueba la hipótesis de que las poblaciones de *F. graminearum* que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan similares niveles de agresividad. Para ello se ha buscado cumplir con el objetivo de determinar la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* provenientes de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires en ensayos de campo mediante la utilización de la técnica de inoculación puntual.

### **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Con la finalidad de evaluar la agresividad de 112 aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de 28 poblaciones de la Provincia de Buenos Aires se condujeron dos ensayos de campo en los años 2008 y 2009 en el mismo lote de la Estación Experimental Julio Hirschhorn perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata (34° 52' S and 57° 58' W).

Los ensayos se implantaron en un suelo Argiudol típico y los experimentos se llevaron a cabo con el cultivar de trigo pan Klein Chajá, un genotipo comercial usualmente cultivado a lo largo del área de producción de la Provincia de Buenos Aires. El cultivar se sembró en parcelas de 7 hileras (3 m de largo x 1,4 m de ancho) a una densidad de 350 plantas m<sup>-2</sup>. Las malezas, insectos y patógenos foliares fueron controlados con agroquímicos recomendados. Los datos diarios de temperatura, precipitaciones pluviales y humedad relativa de 2008 y 2009 se recogieron con una estación meteorológica automatizada.

#### **3.2.1. Producción de inóculo e inoculación**

Los aislamientos de *F. graminearum* se cultivaron durante 5 días en Erlenmeyer conteniendo 50 mL de medio de cultivo líquido de Capellini y Peterson (Capellini y Peterson 1965) a 25°C con agitación a 45 rev min<sup>-1</sup>. Los macroconidios se recolectaron centrifugando los cultivos obtenidos a 3.500 rev min<sup>-1</sup> y 2°C durante 15 min. Las esporas decantadas se re suspendieron en agua destilada estéril y su concentración se ajustó a ≈10.000 esporas mL<sup>-1</sup> usando un hemocitómetro.

La agresividad de los aislamientos se evaluó utilizando la técnica de la inoculación puntual en espigas de trigo de plantas cultivadas a campo. Las espigas se inocularon en la antesis (Zadoks 65) (Zadoks *et al.* 1974). Para ello, la flor inferior de cada una de las dos espiguillas centrales de las espigas a inocular fue marcada con un marcador permanente no tóxico y 5 µL de la suspensión de macroconidios se depositaron entre la lemma y la palea de cada una de las flores marcadas (Figura 10 A). Luego de inoculadas y para favorecer la germinación de los macroconidios, cada espiga se cubrió con una bolsa de polietileno para mantener ≈100% de humedad relativa durante 48 h (Figura 10 B). Las parcelas fueron cubiertas con una malla de media sombra para prevenir el quemado de las espigas por el sol.

Debido al gran número de espigas a inocular en cada experimento, las parcelas fueron subdivididas en bloques uniformes que se inocularon en días sucesivos. Dentro de cada bloque, se seleccionaron al azar para ser inoculadas 5 espigas principales por aislamiento. Cada grupo de cinco espigas se consideró una unidad experimental y como consecuencia se adoptó un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones.



**Figura 10** – Metodología de inoculación de espigas de trigo en ensayos de campo para evaluar la agresividad de 112 aislamientos de *Fusarium graminearum*. (A) Inoculación puntual de una flor de una espiguilla central marcada con una fibra permanente no tóxica; (B) espigas cubiertas con bolsas de polietileno para mantener la humedad relativa  $\approx 100\%$  durante 48 h y favorecer la infección del patógeno.

### 3.2.2. Evaluación de la agresividad

El desarrollo de la FET fue evaluado en cada espiga inoculada individualmente, las cuales se numeraron e identificaron dentro de la parcela experimental. Las espiguillas de cada espiga se numeraron respecto de los puntos de inoculación (PI), los cuales se identificaron como +0, el correspondiente a la espiguilla central superior, y -0, el de la espiguilla central inferior. El resto de las espiguillas fueron numeradas con números positivos y negativos sucesivos de acuerdo con su posición relativa respecto de los PI. Así, las espiguillas +1 y -1 correspondieron a aquellas ubicadas inmediatamente por encima y por debajo de los PI, respectivamente.

La severidad de la FET en las espigas se evaluó visualmente a los 12, 17 y 21 días post inoculación (dpi). En cada fecha de evaluación se registraron como espiguillas sintomáticas aquellas que hubieran desarrollado una lesión que presentara la capacidad de producir macroconidios, teniendo en cuenta su posición en la espiga como fuera descrito previamente. La severidad de la enfermedad se calculó como el porcentaje de espiguillas enfermas (que se corresponde con el concepto de tamaño de la lesión) respecto del número total de espiguillas de cada espiga.

Sobre la base de la severidad de la FET inducida en las espigas 21 dpi, los aislamientos se organizaron en tres grupos caracterizados como bajo, medio y altamente agresivos. Para ello, el valor de severidad promedio de cada aislamiento fue relativizado respecto del valor obtenido para el aislamiento más agresivo. El grupo de agresividad baja incluyó a aquellos aislamientos que indujeron los síntomas de la FET con valores de severidad normalizados menores al 33%, los medianamente agresivos lo hicieron con

valores normalizados mayores o iguales al 33% pero menores al 66%. Los aislamientos caracterizados como altamente agresivos fueron aquellos que indujeron la enfermedad en niveles mayores o iguales al 66% del valor obtenido para el aislamiento más agresivo. Para cada uno de los grupos de aislamientos resultantes se calculó la eficiencia de la infección como el porcentaje de espigas que desarrollaron síntomas respecto del total de las espigas inoculadas.

Se evaluó el desecamiento prematuro de las espigas infectadas por encima del PI y su relación con la agresividad de los aislamientos. Para esto, se calculó el porcentaje de espigas que presentaron este síntoma para cada aislamiento y bloque respecto del total de espigas infectadas. Las espiguillas que presentaron síntomas de desecamiento prematuro no fueron consideradas para el cálculo de la severidad de la enfermedad ya que, de acuerdo con la definición del tamaño de la lesión, no presentan la capacidad de producir macroconidios (Pariaud *et al.* 2009).

Para cada tratamiento considerado se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) a partir de los valores de severidad de la FET registrados de acuerdo con la fórmula de Shaner y Finney (1977):

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n \frac{S_i + S_{i+1}}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

Donde  $S_i$  = severidad de la enfermedad en la observación  $i$ ,  $t_i$  = días a la observación  $i$ , y  $n$  = número total de observaciones.

A la madurez, las espigas inoculadas se cosecharon y trillaron a mano para evitar la pérdida de granos infectados, los cuales se presentan achuzados y de menor peso (Schaafsma *et al.* 2001). El PMG para los bloques de cada tratamiento se obtuvo de acuerdo con el método estándar y se expresó como porcentaje del PMG promedio del tratamiento control de cada año (PMG relativo).

### 3.2.3. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis en bloques completos al azar para cada año de ensayo y las medias se compararon usando el test de comparaciones de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Los datos de agresividad y PMG relativo fueron recogidos en base a una escala proporcional (valores entre 0 y 1) a pesar de que fueron analizados como porcentaje y, como consiguiente, su distribución no es binomial si no continúa. Para estabilizar la varianza de estos datos y ajustarlos a una distribución normal, los mismos fueron transformados usando la función arcoseno de la raíz cuadrada de la probabilidad (Sokal y Rohlf 1995).

Un modelo de análisis combinado (McIntosh 1983) se aplicó a los valores de severidad de la FET a los 21 dpi, PMG relativo y ABCPE de los aislamientos de *F. graminearum*:  $Y_{ijm} = \mu + (\rho/\beta)_{jm} + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijm}$ ; donde:  $Y_{ijm}$  = variación fenotípica  $ijm$ ;  $i = 1, \dots, g$ ;  $j = 1, \dots, e$ ;  $m = 1, \dots, r$ ;  $g$  = número de aislamientos (genotipos);  $m$  = número de bloques por cada experimento;  $e$  = número de ambientes o años de ensayos de campo;  $\mu$  = medias paramétricas;  $(\rho/\beta)_{jm}$  = efecto del bloque  $j$  dentro del experimento  $m$ ;  $\alpha_i$  = efecto del aislamiento (genotipo)  $i$ ;  $\beta_j$  = efecto del ambiente  $j$ ;  $\alpha\beta_{ij}$  = efecto de la interacción genotipo-ambiente  $ij$ ;  $\varepsilon_{ijm}$  = efecto del error residual  $ijm$ .

Los componentes de la varianza fenotípica se estimaron a partir de los cuadrados medios esperados y la heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) se calculó de acuerdo con la fórmula desarrollada por Fehr (1987):

$$H^2 = \hat{\sigma}_G^2 / [\hat{\sigma}_G^2 + (\hat{\sigma}_{GE}^2 / e) + (\hat{\sigma}_e^2 / e r)]$$

donde:  $\hat{\sigma}_G^2$  varianza de genotipos;  $\hat{\sigma}_E^2$ : varianza de ambientes o años de ensayos de campo;  $\hat{\sigma}_{GE}^2$ : varianza de la interacción genotipo-ambiente;  $\hat{\sigma}_e^2$ : varianza del error; g: número de genotipos (aislamientos); e: número de ambientes; r: número de bloques de inoculación por experimento. Un alto valor de heredabilidad implica que la mayor parte de la variabilidad observada en la población es causada por la variabilidad en los genotipos.

Para todas las combinaciones de parámetros se llevaron adelante análisis de correlación de Pearson con  $\alpha = 0,05$ . Con esta metodología se compararon la severidad de los síntomas de la FET promedio de cada bloque de inoculación a los 21 dpi con el PMG relativo correspondiente; la severidad 21 dpi con el ABCPE promedio para cada bloque; y los ABCPE y PMG relativos para cada bloque. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático Statistix v.8.

### **3.3. RESULTADOS**

El desarrollo de los síntomas de la FET en las espigas de plantas de trigo cultivadas a campo e inoculadas mediante inoculación puntual con esporas de 112 aislamientos de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires se muestra en la Figura 11.

La lluvia total caída en un período de 15 días alrededor de la antesis fue de 26 mm en el año 2008 y 23 mm en el 2009. El evento de precipitación pluvial más cercano a la antesis ocurrió 9 días antes de la inoculación del primer bloque de espigas en el año 2008 y 8 días antes en el año 2009. La temperatura media del aire y humedad relativa en el mismo período fueron de 17°C y 67% para el año 2008 y de 18°C y 69% para el 2009, con temperaturas mínimas y máximas medias de 11°C y 24°C, y 12°C y 23°C, respectivamente.

El 70% de las espigas inoculadas desarrollaron los síntomas de la FET. Todos los aislamientos indujeron los síntomas (Figura 11) sobre el hospedante susceptible y la mayor parte de ellos redujeron el peso de los granos desarrollados en las espigas inoculadas. En ninguno de los años de ensayo se observó infección natural de las espigas.

La heredabilidad en sentido amplio ( $H^2$ ) se calculó para los estimadores de la severidad de la FET considerados. Los valores obtenidos resultaron altos para la severidad de los síntomas ( $H^2 = 0,91$ ), el PMG relativo al tratamiento control ( $H^2 = 0,84$ ) y el ABCPE ( $H^2 = 0,89$ ) (Tabla 5).

Los valores obtenidos para la varianza de la interacción entre los genotipos y los años de inoculación resultaron mucho menores que los obtenidos para la varianza de los genotipos y las diferencias no resultaron significativas. Estos resultados sugieren que una porción sustancial de la variabilidad fenotípica observada en los estimadores de la



agresividad de *F. graminearum* fue causada por la variabilidad existente entre los genotipos.



**Figura 11** – Desarrollo de síntomas de la Fusariosis de la Espiga (FET) en las espigas de plantas de trigo inoculadas con 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* de la Provincia de Buenos Aires en dos años de ensayos de campo. (A) espigas inoculadas sintomáticas y asintomáticas; (B) desarrollo de síntomas necróticos en el raquis de espigas sintomáticas; (C) esporodocios conteniendo macroconidios de *F. graminearum* sobre una espiguilla de trigo con síntomas de FET.

**Tabla 5** – Estimaciones de los componentes de la varianza y heredabilidades ( $H^2$ ) de la severidad de la fusariosis de la espiga de trigo (FET) a los 21 días post inoculación (dpi), peso de mil granos relativo al control sin inocular (PMG) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) para 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de plantas de trigo en 2 años de ensayos de campo.

FUENTE	21 dpi	ABCPE	PMG
<b>Genotipos (G)</b>	0,30811**	172438**	0,03937**
<b>Años (A)</b>	0,10732	547184**	0,0101
<b>G x A</b>	0,04753	31798	0,0119
<b>Error</b>	0,04211	27681	0,0106
<b><math>H^2</math></b>	<b>0,91</b>	<b>0,89</b>	<b>0,84</b>

\*\* = significativo a  $P = 0,01$

Los aislamientos evaluados difirieron significativamente en su habilidad para inducir síntomas de FET como fue indicado por la severidad inducida a los 21 dpi promedio para los dos años de ensayo ( $F = 3,25$ ;  $p < 0,01$ ). La severidad promedio inducida fue variable entre los aislamientos y se ubicó entre 2% para el aislamiento MP2 y 50% para el aislamiento SP1.

Para estimar la posible influencia del origen geográfico de los aislamientos en su agresividad, los 40 aislamientos provenientes de Miramar (véanse la Figura 7 y la Tabla 2 en el Capítulo II) fueron sometidos a ANOVA. Se encontró que los mismos indujeron valores de severidad de la FET a los 21 dpi significativamente diferentes entre sí ( $F = 3,51$ ;  $p < 0,01$ ). Los valores hallados oscilaron entre un mínimo de 6% para el aislamiento MR18 y un máximo de 31% para el aislamiento MR42 (Tabla 6).

**Tabla 6** - Severidad de los síntomas de la fusariosis de la espiga de trigo (FET) a los 21 días post inoculación (dpi), peso de mil granos relativo al control sin inocular (PMG) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) inducidos por 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de plantas de trigo en 2 años de ensayos de campo.

<b>AISLAMIENTO</b>	<b>21 dpi (%)</b>	<b>ABCPE</b>	<b>PMG</b>
SP1	50 <sup>a</sup>	398 <sup>a</sup>	65 <sup>d</sup>
R3	42 <sup>ab</sup>	290 <sup>abc</sup>	69 <sup>bcd</sup>
A6	40 <sup>abc</sup>	289 <sup>abc</sup>	64 <sup>d</sup>
RP4	39 <sup>abcd</sup>	299 <sup>ab</sup>	66 <sup>cd</sup>
R2	37 <sup>abcd</sup>	252 <sup>abcdef</sup>	71 <sup>abcd</sup>
PH1	37 <sup>abcd</sup>	281 <sup>abcd</sup>	65 <sup>cd</sup>
R4	36 <sup>abcd</sup>	226 <sup>abcdefgh</sup>	73 <sup>abcd</sup>
LF2	35 <sup>abcde</sup>	281 <sup>abcd</sup>	70 <sup>bcd</sup>
A5	35 <sup>abcde</sup>	257 <sup>abcdef</sup>	71 <sup>abcd</sup>
R1	34 <sup>abcde</sup>	290 <sup>abc</sup>	72 <sup>abcd</sup>
AZ1	33 <sup>abcde</sup>	271 <sup>abcde</sup>	71 <sup>abcd</sup>
PL1	32 <sup>abcde</sup>	235 <sup>abcdefgh</sup>	77 <sup>abcd</sup>
CH1	31 <sup>abcdef</sup>	217 <sup>abcdefgh</sup>	78 <sup>abcd</sup>
BA3	31 <sup>abcdef</sup>	186 <sup>abcdefgh</sup>	79 <sup>abcd</sup>
MR42	31 <sup>abcdef</sup>	212 <sup>abcdefgh</sup>	71 <sup>abcd</sup>
CRV1	30 <sup>abcdef</sup>	174 <sup>bcdefgh</sup>	77 <sup>abcd</sup>
N2	30 <sup>abcdef</sup>	209 <sup>abcdefgh</sup>	69 <sup>bcd</sup>
CH2	29 <sup>abcdef</sup>	203 <sup>abcdefgh</sup>	71 <sup>abcd</sup>
MP1	29 <sup>abcdef</sup>	198 <sup>abcdefgh</sup>	75 <sup>abcd</sup>
BA15	28 <sup>abcdef</sup>	160 <sup>bcdefgh</sup>	79 <sup>abcd</sup>
BA14	27 <sup>abcdef</sup>	157 <sup>bcdefgh</sup>	82 <sup>abcd</sup>
N3	27 <sup>abcdef</sup>	242 <sup>abcdefg</sup>	82 <sup>abcd</sup>
LH11	26 <sup>abcdef</sup>	139 <sup>bcdefgh</sup>	75 <sup>abcd</sup>
PL4	26 <sup>abcdef</sup>	200 <sup>abcdefgh</sup>	74 <sup>abcd</sup>
BA5	25 <sup>abcdef</sup>	153 <sup>bcdefgh</sup>	78 <sup>abcd</sup>
LF1	25 <sup>abcdef</sup>	145 <sup>bcdefgh</sup>	86 <sup>abcd</sup>
LH8	25 <sup>abcdef</sup>	136 <sup>bcdefgh</sup>	84 <sup>abcd</sup>
30A3	25 <sup>abcdef</sup>	117 <sup>bcdefgh</sup>	91 <sup>abcd</sup>
25M1	24 <sup>abcdef</sup>	172 <sup>bcdefgh</sup>	77 <sup>abcd</sup>
LH4	24 <sup>abcdef</sup>	119 <sup>bcdefgh</sup>	85 <sup>abcd</sup>
PL2	24 <sup>abcdef</sup>	214 <sup>abcdefgh</sup>	77 <sup>abcd</sup>
MR41	23 <sup>abcdef</sup>	152 <sup>bcdefgh</sup>	80 <sup>abcd</sup>
MR38	23 <sup>abcdef</sup>	119 <sup>bcdefgh</sup>	86 <sup>abcd</sup>
TA1	23 <sup>abcdef</sup>	124 <sup>bcdefgh</sup>	84 <sup>abcd</sup>
BA11	23 <sup>abcdef</sup>	113 <sup>bcdefgh</sup>	87 <sup>abcd</sup>
MR37	23 <sup>abcdef</sup>	110 <sup>bcdefgh</sup>	77 <sup>abcd</sup>
MR46	23 <sup>abcdef</sup>	139 <sup>bcdefgh</sup>	80 <sup>abcd</sup>
BA9	22 <sup>abcdef</sup>	115 <sup>bcdefgh</sup>	89 <sup>abcd</sup>
MR26	22 <sup>abcdef</sup>	146 <sup>bcdefgh</sup>	82 <sup>abcd</sup>
GB3	22 <sup>abcdef</sup>	156 <sup>bcdefgh</sup>	77 <sup>abcd</sup>
RP1	22 <sup>abcdef</sup>	139 <sup>bcdefgh</sup>	78 <sup>abcd</sup>
LH7	22 <sup>abcdef</sup>	101 <sup>bcdefgh</sup>	84 <sup>abcd</sup>
SP3	22 <sup>abcdef</sup>	172 <sup>bcdefgh</sup>	85 <sup>abcd</sup>
LH2	21 <sup>abcdef</sup>	108 <sup>bcdefgh</sup>	91 <sup>abcd</sup>



Tabla 6 - Continuación

<b> AISLAMIENTO</b>	<b> 21 dpi (%)</b>	<b> ABCPE</b>	<b> PMG</b>
LH5	21 abcdef	103 bcdefgh	90 abcd
BA4	29 abcdef	176 bcdefgh	74 abcd
MR45	21 abcdef	153 bcdefgh	83 abcd
N1	21 abcdef	147 bcdefgh	83 abcd
MR5	21 abcdef	105 bcdefgh	85 abcd
TL3	21 abcdef	149 bcdefgh	85 abcd
A2	20 abcdef	155 bcdefgh	89 abcd
BR1	20 abcdef	137 bcdefgh	73 abcd
M13	20 abcdef	114 bcdefgh	77 abcd
BA6	20 abcdef	132 bcdefgh	84 abcd
MR3	20 bcdef	105 bcdefgh	88 abcd
GB1	20 bcdef	152 bcdefgh	79 abcd
MR39	19 bcdef	121 bcdefgh	81 abcd
MR14	19 bcdef	124 bcdefgh	84 abcd
MR9	19 bcdef	104 bcdefgh	85 abcd
MR16	19 bcdef	140 bcdefgh	83 abcd
MR22	19 bcdef	111 bcdefgh	85 abcd
MR12	19 bcdef	106 bcdefgh	85 abcd
MR36	18 bcdef	91 bcdefgh	89 abcd
BA12	18 bcdef	104 bcdefgh	88 abcd
BA13	18 bcdef	76 cdefgh	98 ab
IVii3	18 bcdef	111 bcdefgh	86 abcd
LH12	18 bcdef	85 bcdefgh	88 abcd
MR29	17 bcdef	89 bcdefgh	85 abcd
LH6	17 bcdef	82 bcdefgh	81 abcd
9J1	17 bcdef	112 bcdefgh	99 ab
BA1	17 bcdef	112 bcdefgh	89 abcd
CR2	17 bcdef	90 bcdefgh	86 abcd
LH9	17 bcdef	91 bcdefgh	89 abcd
MR21	17 bcdef	90 bcdefgh	85 abcd
MR33	17 bcdef	123 bcdefgh	79 abcd
MR48	17 bcdef	83 bcdefgh	90 abcd
AR1	17 bcdef	106 bcdefgh	78 abcd
BA2	16 bcdef	103 bcdefgh	86 abcd
A4	16 bcdef	109 bcdefgh	85 abcd
GA2	16 bcdef	122 bcdefgh	84 abcd
MR1	16 bcdef	70 defgh	90 abcd
MR2	16 bcdef	79 cdefgh	81 abcd
MR19	16 bcdef	95 bcdefgh	89 abcd
MR23	16 bcdef	64 efgh	91 abcd
GB4	15 bcdef	137 bcdefgh	87 abcd
MR32	15 bcdef	86 bcdefgh	88 abcd
BV1	15 bcdef	114 bcdefgh	90 abcd
SP2	15 bcdef	79 cdefgh	91 abcd
MR35	14 bcdef	66 defgh	90 abcd
LH1	14 bcdef	69 defgh	95 abcd
MR40	14 bcdef	77 cdefgh	87 abcd
GA1	14 bcdef	109 bcdefgh	90 abcd

Tabla 6 - Continuación

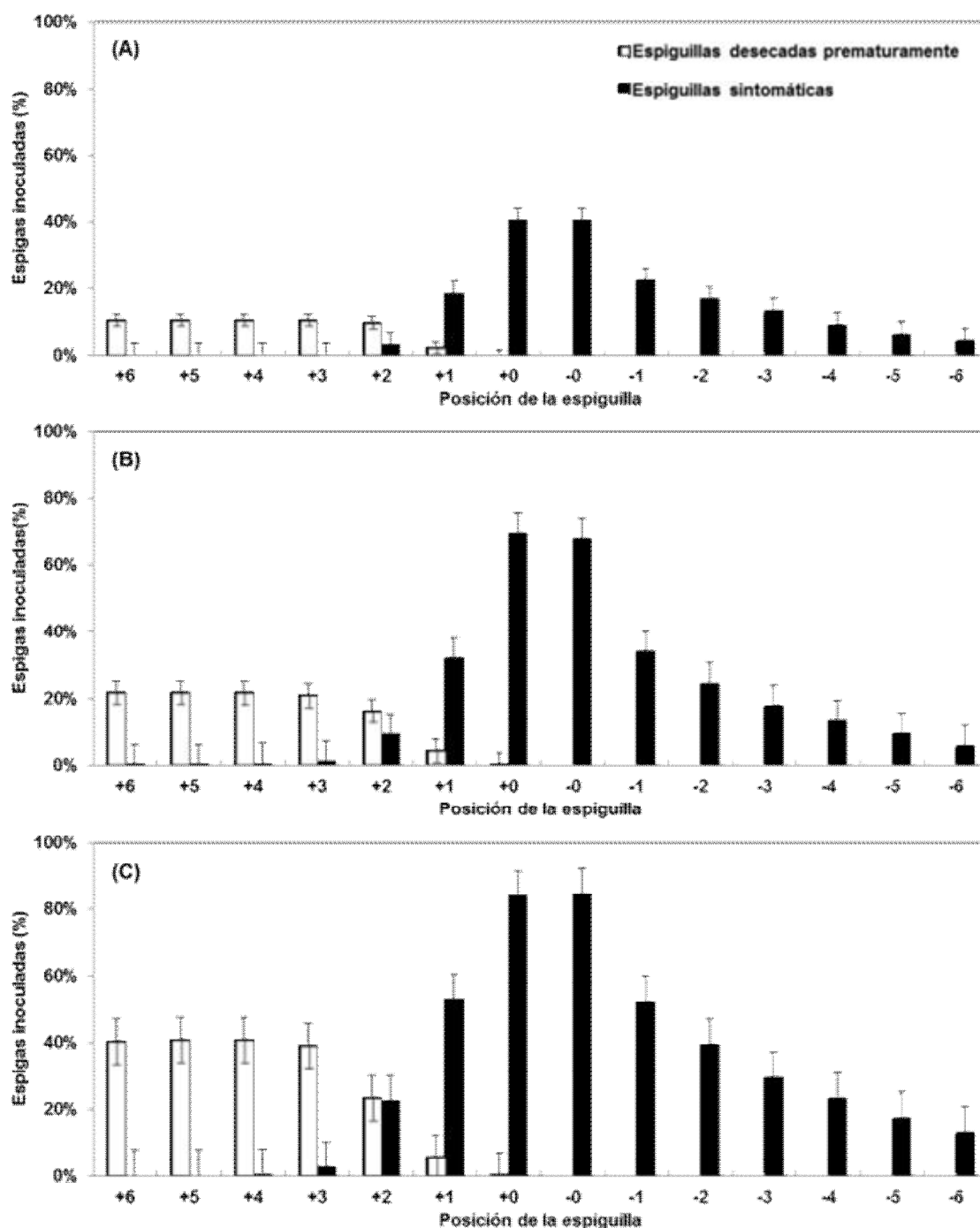
<b> AISLAMIENTO</b>	<b> 21 dpi (%)</b>	<b> ABCPE</b>	<b> PMG</b>
MR43	14 <sup>bcdef</sup>	73 <sup>cdefgh</sup>	94 <sup>abcd</sup>
MR15	18 <sup>bcdef</sup>	88 <sup>bcdefgh</sup>	88 <sup>abcd</sup>
RJ5	13 <sup>bcdef</sup>	130 <sup>bcdefgh</sup>	74 <sup>abcd</sup>
TD1	13 <sup>bcdef</sup>	99 <sup>bcdefgh</sup>	83 <sup>abcd</sup>
BA10	13 <sup>bcdef</sup>	61 <sup>efgh</sup>	96 <sup>abc</sup>
LF3	13 <sup>bcdef</sup>	120 <sup>bcdefgh</sup>	85 <sup>abcd</sup>
RP2	13 <sup>bcdef</sup>	98 <sup>bcdefgh</sup>	83 <sup>abcd</sup>
MR28	13 <sup>bcdef</sup>	84 <sup>bcdefgh</sup>	95 <sup>abcd</sup>
TL2	13 <sup>bcdef</sup>	71 <sup>defgh</sup>	91 <sup>abcd</sup>
BA8	12 <sup>bcdef</sup>	55 <sup>efgh</sup>	88 <sup>abcd</sup>
MR24	12 <sup>bcdef</sup>	50 <sup>fgh</sup>	92 <sup>abcd</sup>
TL4	12 <sup>bcdef</sup>	55 <sup>efgh</sup>	98 <sup>ab</sup>
GB2	12 <sup>cdef</sup>	85 <sup>bcdefgh</sup>	102 <sup>a</sup>
MR30	11 <sup>cdef</sup>	49 <sup>fgh</sup>	91 <sup>abcd</sup>
MR7	11 <sup>cdef</sup>	71 <sup>defgh</sup>	91 <sup>abcd</sup>
MR25	11 <sup>cdef</sup>	59 <sup>efgh</sup>	92 <sup>abcd</sup>
MR4	10 <sup>def</sup>	52 <sup>fgh</sup>	91 <sup>abcd</sup>
MR31	9 <sup>def</sup>	42 <sup>fgh</sup>	95 <sup>abcd</sup>
MR18	6 <sup>ef</sup>	27 <sup>gh</sup>	94 <sup>abcd</sup>
MP2	2 <sup>f</sup>	20 <sup>h</sup>	91 <sup>abcd</sup>

Letras distintas dentro de la misma variable indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ).

Sobre la base de los resultados obtenidos en ambos años de ensayo los aislamientos fueron organizados en tres grupos que se diferenciaron según si su agresividad resultó baja, media o alta. Estos grupos incluyeron aproximadamente el 12%, el 57% y el 31% de todas las espigas inoculadas, respectivamente.

Tanto la severidad de la enfermedad ( $F = 116$ ;  $p < 0,01$ ) como la eficiencia de la infección ( $F = 70,1$ ;  $p < 0,01$ ) resultaron significativamente distintos entre los grupos. Mientras que el 40% de las espigas inoculadas con aislamientos de agresividad baja desarrollaron síntomas de FET, cuando se inocularon aislamientos de agresividad media y alta este porcentaje ascendió al 70% y al 84%, respectivamente (Figura 12). La severidad de la enfermedad promedio en cada grupo fue de 11%, 19% y 28%, respectivamente.

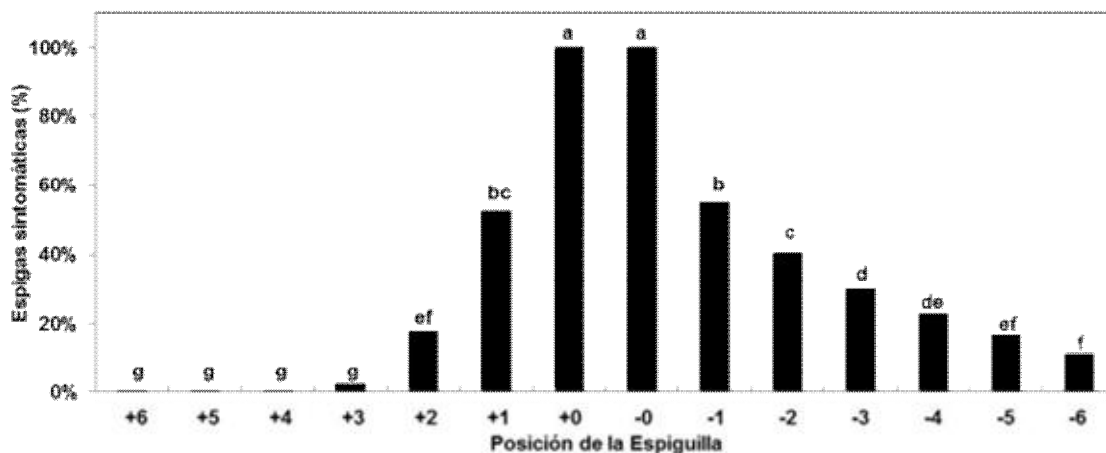
La tasa de desarrollo de la enfermedad también resultó variable entre los grupos descritos. Mientras que no se verificaron diferencias para la expansión de los síntomas desde el PI hacia la porción basal de las espigas sintomáticas ( $F = 0,98$ ); la expansión hacia el ápice de las mismas difirió significativamente entre los grupos ( $F = 15$ ;  $p < 0,01$ ). Los aislamientos altamente agresivos mostraron una expansión hacia las espiguillas ubicadas por encima del PI significativamente superior a la observada para los aislamientos de agresividades bajas y medias. En el grupo de menor desarrollo de síntomas, el 42% y 59% de las espigas sintomáticas mostraron expansión de la enfermedad hacia las espiguillas +1 y -1, respectivamente, mientras que para los grupos de agresividades medias y altas, estos porcentajes fueron de 47% y 57%, y 64% y 64%, respectivamente.



**Figura 12** - Porcentaje sobre el total de las espigas de plantas de trigo inoculadas con 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* en dos años de ensayos de campo que indujeron síntomas de Fusariosis de la Espiga (FET) por encima y por debajo del punto de inoculación (PI) y síntomas de desecamiento prematuro a los 21 días post inoculación para 3 grupos de agresividad: (A) aislamientos de baja agresividad, (B) aislamientos de agresividad media, y (C) aislamientos de agresividad alta. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del PI y los negativos aquellas ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente)

La expansión del patógeno en la espiga ocurrió principalmente hacia abajo del PI ( $F = 60,3$ ;  $p < 0,01$ ). Considerando sólo las espigas sintomáticas de ambos años de ensayos, no se observaron diferencias en el porcentaje de espigas que presentaron síntomas de FET en las espiguillas +1 y -1. Sin embargo, en la porción apical de las espigas este porcentaje decreció rápidamente: el 17,8% de las espigas sintomáticas presentaron síntomas de FET en la espiguilla +2, el 1,5% en la espiguilla +3, mientras

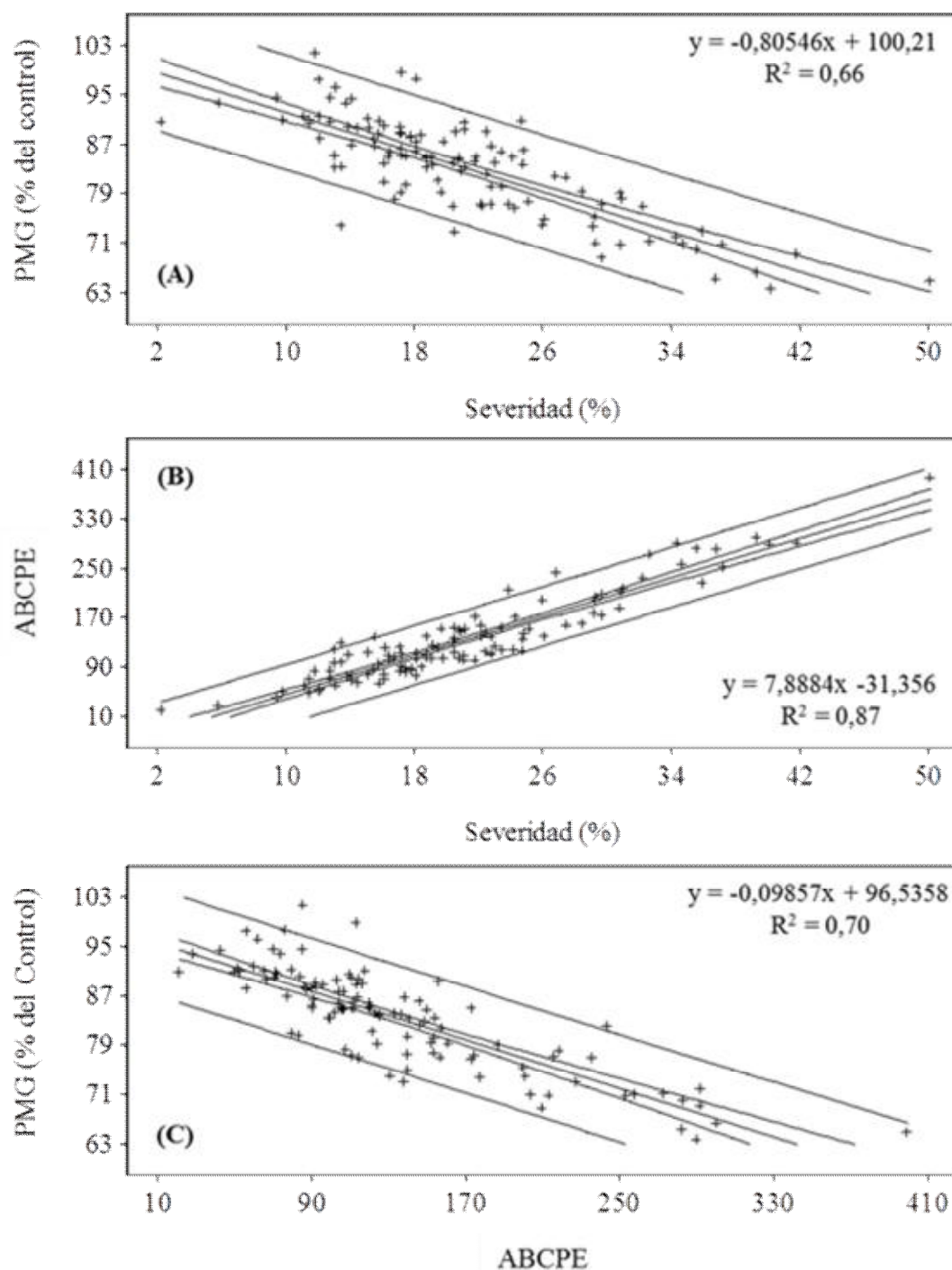
que solo 4 espigas mostraron síntomas de FET a la altura de la espiguilla +4. Debajo del PI, la reducción en la expansión de los síntomas resultó menos pronunciada con valores de 11,1% del total de espigas infectadas con síntomas visibles al nivel de la espiguilla -6 (Figura 13).



**Figura 13** - Porcentaje de espigas de trigo con síntomas visibles de Fusariosis de la Espiga (FET) por encima y por debajo del punto de inoculación (PI) a los 21 días post inoculación. Valores obtenidos del total de espigas sintomáticas inoculadas con 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* en 2 años de ensayos de campo. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del PI y los negativos las ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 14** - Desarrollo de síntomas de desecamiento prematuro en la porción apical de espigas de plantas de trigo inoculadas con aislamientos de *Fusarium graminearum* procedentes de la Provincia de Buenos Aires en ensayos de campo.



**Figura 15** – Análisis de regresión de 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* inoculados en espigas de plantas de trigo cultivadas a campo mediante inoculación puntual (PI) entre: (A) la severidad de la infección inducida y el peso de mil granos (PMG) relativo al control sin inocular; (B) la severidad de la infección inducida y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad inducida (ABCPE); y (C) el ABCPE y el PMG.

Aproximadamente el 40% de las espigas sintomáticas presentaron síntomas de desecamiento prematuro (Figura 14). Los grupos de agresividad conformados difirieron significativamente en el porcentaje de espigas con síntomas visibles de desecamiento prematuro ( $F = 18,6$ ;  $p < 0,01$ ), alcanzando porcentajes del 11%, 32% y 49% de las espigas consideradas dentro de los grupos de agresividad baja, media y alta,

respectivamente. Estos resultados fueron confirmados por la correlación encontrada entre los valores de severidad de la FET a los 21 dpi y porcentaje de espigas con síntomas de desecamiento prematuro, la cual resultó altamente significativa ( $r = 0,65$ ;  $p < 0,01$ ).

Los valores de ABCPE obtenidos mostraron la existencia de diferencias significativas entre los aislamientos ( $F = 3,92$ ;  $p < 0,01$ ). Para el PMG relativo, por su parte, las diferencias encontradas fueron menores ( $F = 1,83$ ;  $p < 0,05$ ).

Cuando se consideró el total de las espigas inoculadas en ambos años de ensayo se encontró que las correlaciones entre la severidad de la FET a los 21 dpi y el ABCPE ( $r = 0,88$ ;  $p < 0,01$ ), la severidad y el PMG relativo al control sin inocular ( $r = -0,71$ ;  $p < 0,01$ ), y el ABCPE y el PMG ( $r = -0,66$ ;  $p < 0,01$ ) resultaron altamente significativas. Los valores de correlación obtenidos se correspondieron con los observados en los análisis de regresión lineal llevados a cabo para las comparaciones entre las tres variables (Figura 15).

### **3.4. DISCUSIÓN**

El presente capítulo proporciona información respecto del comportamiento de un gran número de aislamientos de *F. graminearum* recolectados de un amplio rango de localidades y ambientes del área de producción triguera de la Argentina y constituye uno de los pocos estudios disponibles sobre la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* evaluada mediante inoculación artificial en espigas de plantas de trigo cultivadas a campo.

Los ensayos de patogenicidad fueron conducidos bajo condiciones de campo utilizando la técnica de inoculación puntual. Este método se encuentra menos afectado por el ambiente y permitió el seguimiento de la expansión de la FET en la espiga (Schroeder y Christensen 1963). En un estudio llevado a cabo en múltiples ambientes, Miedaner *et al.* (2003) compararon la utilidad de las técnicas de inoculación por aspersión e inoculación puntual para evaluar la resistencia del trigo a la FET. Los autores encontraron que ambos procedimientos resultaron en niveles similares de severidad de la enfermedad en cada ambiente. Debido a que la inoculación puntual es un método trabajoso y lento de llevar adelante, generalmente se utiliza exclusivamente en ensayos conducidos bajo condiciones controladas, mientras que en ensayos de campo con gran número de poblaciones de patógenos u hospedantes a evaluar se utiliza frecuentemente la técnica de inoculación por aspersión (Dill-Macky 2003).

El comportamiento de los patógenos bajo condiciones naturales de cultivo resulta particularmente importante cuando se estudia su agresividad. Mientras que el ambiente generado bajo condiciones controladas en los invernáculos favorece el desarrollo temprano y rápido de los síntomas de la FET, los síntomas producidos en condiciones naturales se verían afectados en mayor medida por factores ambientales como la temperatura y la humedad. En este capítulo la técnica de inoculación puntual permitió no solo estudiar la agresividad de un gran número de aislamientos de *F. graminearum* sino analizar también el desarrollo de los síntomas de la FET en gran cantidad de espigas de plantas de trigo cultivadas a campo.

Para que la infección de la espiga de trigo por parte de *F. graminearum* resulte exitosa es necesario que ocurran condiciones ambientales de abundante humedad alrededor de la anthesis del cultivo. En la Argentina, Moschini y Fortugno (1996) encontraron que alrededor de la floración, el número de períodos de dos días con

presencia de lluvias y humedad relativa  $>81\%$  y  $>78\%$  en el primero y segundo día, respectivamente, resulta la variable que presenta mayor asociación con el ataque de FET. La temperatura también influencia el proceso infectivo, ya que mínimas diarias menores a  $9^{\circ}\text{C}$  y máximas diarias mayores a  $26^{\circ}\text{C}$  podrían inhibir el desarrollo del patógeno. En nuestro estudio, las condiciones de temperatura alrededor de la floración resultaron apropiadas para la infección de *F. graminearum*, mientras que las condiciones de humedad no alcanzaron los requerimientos necesarios para el desarrollo de la FET. Como resultado, en ninguno de los dos años de experimentos se encontró la ocurrencia de infecciones naturales en las espigas de los tratamientos testigos. En los tratamientos inoculados, por su parte, el desarrollo de los síntomas de la enfermedad se incentivó cubriendo cada una de las espigas con una bolsa plástica para mantener una humedad relativa de  $\approx 100\%$  durante 48 h que favoreciera la infección inicial.

Todos los aislamientos de *F. graminearum* incluidos en el presente trabajo indujeron en las espigas inoculadas los síntomas típicos de la FET. Las estimaciones de la agresividad de los mismos hacia el genotipo de trigo ensayado resultó un rasgo altamente heredable, como lo demuestran los altos valores de heredabilidad obtenidos tanto para la severidad de los síntomas de la FET ( $H^2 = 0,91$ ), como para el PMG relativo al tratamiento control ( $H^2 = 0,84$ ) y el ABCPE ( $H^2 = 0,89$ ) (Tabla 5). La interacción entre los aislamientos y el año de ensayo resultó no significativa para todos los parámetros, pudiendo concluirse de los datos obtenidos que una gran proporción de la variabilidad encontrada fue debida a efectos genéticos. Valores de heredabilidad de la agresividad similares fueron encontrados por otros autores trabajando con poblaciones de *F. graminearum* (Miedaner *et al.* 1996; Cumagun y Miedaner 2003).

La técnica de inoculación utilizada y la evaluación individual de las espigas inoculadas permitieron estudiar distintos componentes de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*. Se analizaron dos aspectos de la capacidad de los aislamientos de inducir enfermedad: (i) la eficiencia de la infección, la cual refleja la habilidad de producir síntomas (Pariaud *et al.* 2009), que fue evaluada como el número de espigas sintomáticas sobre el total inoculado; y (ii) la severidad de la FET que refleja el tamaño de la lesión (Pariaud *et al.* 2009) inducida por el patógeno en las espigas y que fue evaluada como cociente entre el número de espiguillas con síntomas sobre su número total.

La severidad de la enfermedad inducida por los aislamientos resultó variable y no estuvo estructurada geográficamente, como fue demostrado por el variado nivel de agresividad observado en las espigas de trigo inoculadas con los aislamientos provenientes de la población de Miramar. Estos resultados indicarían que el agrupamiento de los aislamientos de dicha localidad de acuerdo con los resultados obtenidos a partir de marcadores moleculares ISSR (véase el Capítulo II) no tendría su correlato en aspectos fenotípicos relacionados con la agresividad de *F. graminearum*.

Diferencias significativas en la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* y similares niveles de diversidad han sido reportados en trabajos previos (Miedaner *et al.* 1996; Walker *et al.* 2001; Carter *et al.* 2002). Sin embargo, sólo hay disponible un trabajo sobre la variabilidad presente en los aislamientos de la Argentina (Álvarez *et al.* 2010) y el mismo corresponde a ensayos llevados adelante en condiciones controladas con un limitado número de aislamientos. Álvarez *et al.* (2010) observaron la presencia de variabilidad entre las cepas de *F. graminearum* consideradas en su trabajo aunque solo encontraron diferencias significativas en la severidad de los síntomas de la FET inducidos por dos aislamientos. Con un mayor número de aislamientos pertenecientes a

un amplio rango de localidades, el presente trabajo representa un avance en el conocimiento de la variación de la agresividad presente en las poblaciones de *F. graminearum* de la Argentina.

La severidad de la enfermedad observada para cada aislamiento 21 dpi se normalizó teniendo en cuenta el máximo valor obtenido para cada uno de los ensayos de campo y se conformaron tres grupos según si la agresividad de los aislamientos resultó baja, media o alta. Estos grupos presentaron diferencias significativas en la eficiencia de la infección y la severidad de la FET inducida.

El porcentaje de espigas sintomáticas y la severidad de los síntomas inducidos son importantes índices del nivel de agresividad de los aislamientos. Estos dos aspectos del desarrollo de la FET no han sido abordados usualmente por los autores que han trabajado con poblaciones del patógeno, los cuales generalmente han reportado solo las diferencias en la agresividad como la media de la severidad de los síntomas en las espigas.

Los síntomas de la FET se expandieron principalmente hacia la base de las espigas inoculadas, por debajo del PI (Figura 13). Savard *et al.* (2000) reportaron altos niveles de DON en todas las espiguillas ubicadas por debajo del PI de una espiguilla central en un cultivar susceptible, pero escasa acumulación de este tricoteceno sobre el PI. Sin embargo, los autores no evaluaron la presencia del patógeno en las espigas o la relación entre la acumulación de DON y los síntomas visuales de la infección.

El atizonado y la deformación de las aristas usualmente asociados con el desecamiento prematuro de la espiga fueron observados en el presente trabajo en numerosos aislamientos en ambos años de ensayos. Bai y Shaner (1996) encontraron que la desecación de la porción superior de las espigas puede ocurrir tan temprano como un día después de la aparición de los síntomas, probablemente debido a las deficiencias de agua y nutrientes resultantes de la disfunción vascular causada por la invasión del raquis por parte del patógeno. En el presente trabajo, el desecamiento prematuro de las espigas resultó ser una función de la agresividad de los aislamientos. Las espigas inoculadas con los aislamientos menos agresivos presentaron menor proporción de síntomas de desecamiento prematuro que las inoculadas con los aislamientos más agresivos, los cuales provocaron dicha sintomatología en algunos casos incluso dentro de los 7 días siguientes a la inoculación. Esta relación fue convalidada por la estrecha correlación encontrada entre el porcentaje de desecamiento prematuro y la severidad de los síntomas.

Los resultados obtenidos sugieren que se debe tener especial cuidado cuando se evalúan la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* y la respuesta de cultivares de trigo a la FET utilizando estimaciones visuales de la severidad de la enfermedad. Habitualmente el desecamiento prematuro resulta en la sobrestimación del impacto de la infección cuando éste es confundido con los síntomas inducidos por el patógeno. En el presente trabajo las espiguillas desecadas prematuramente no fueron consideradas al estimar la severidad de la enfermedad debido a que en ningún caso desarrollaron lesiones capaces de producir esporodocios conteniendo los macroconidios de *F. graminearum*. Argyris *et al.* (2005) encontraron que la razón principal para la escasa relación entre la infección de los granos y la estimación visual del alcance de la infección de las espiguillas fue la falta de movimiento de *F. graminearum* hacia las semillas y otras porciones florales ubicadas sobre el PI y el desecamiento prematuro de las espiguillas de la porción apical de la espiga. Snijders y Krechting (1992), por su parte, reportaron que la expansión de la infección desde las espiguillas hacia el raquis



causó el desecamiento prematuro de las espigas y llevó a una mayor variabilidad en las estimaciones de los contenidos de DON y ergosterol cuando la infección de las espiguillas fue evaluada visualmente.

En las condiciones de los ensayos, la estimación visual de la severidad de la FET reflejó las disminuciones en el PMG encontradas. Una correlación cercana pudo ser verificada entre la agresividad de los aislamientos y los valores para ellos obtenidos tanto de ABCPE como de PMG, así como entre estos últimos.

La evaluación visual de la severidad de la FET es útil para estimar la proporción de tejido vegetal afectada por el patógeno pero presenta la desventaja de que solo puede ser evaluada durante un breve espacio de tiempo entre la antesis y la madurez del cultivo. En contraste, la reducción del peso del grano como resultado de la infección con *F. graminearum* tiene lugar durante un período de tiempo más prolongado, finalizando con la cosecha del cultivo (Mesterházy 2003). La estrecha relación entre el PMG y la severidad de los síntomas encontrada demuestra que ambos parámetros pueden ser usados indistintamente como estimadores de la capacidad de los aislamientos de *F. graminearum* para inducir la FET. Estos resultados están en desacuerdo con los obtenidos por Álvarez *et al.* (2010), quienes no encontraron correlación entre ambos parámetros en ensayos realizados en condiciones controladas con aislamientos de la Argentina. Los autores concluyeron que, debido a la heterogeneidad de la ABCPE y de la reducción en el peso del grano encontradas, éstos no resultaron ser estimadores confiables de la habilidad de los aislamientos para ocasionar la FET.

Las epidemias de FET no ocurren usualmente en años sucesivos debido a condiciones ambientales no predisponentes. La ausencia de la enfermedad impide llevar adelante programas de mejoramiento varietal tendientes a obtener cultivares de trigo de buen comportamiento sobre la base de procesos de infección natural. En este escenario, resultan fundamentales las pruebas de patogenicidad utilizando la inoculación de aislamientos de *F. graminearum*.

Para alcanzar el propósito de obtener materiales de trigo resistentes o tolerantes a la FET, el conocimiento de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* a utilizar en las pruebas de patogenicidad resulta uno de los aspectos más importantes. Según Mesterházy (2003), las pruebas indirectas para determinar la agresividad de los aislamientos no están directamente relacionadas con su capacidad de producir los síntomas de la FET. Es por este motivo que para la correcta selección de los genotipos a utilizar en los programas de mejoramiento resulta necesario llevar adelante pruebas de patogenicidad (de Galich 1997).

A través del seguimiento del desarrollo de la FET en espigas de plantas de trigo cultivadas a campo e inoculadas mediante inoculación puntual, en el presente capítulo se encontraron altos niveles de variabilidad en la agresividad, conformada por el efecto integrado de la eficiencia de la infección y el tamaño de la lesión, de los aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina. La existencia de altos niveles de variabilidad en la agresividad y el hecho de que ésta no se encuentre estructurada geográficamente subrayan la necesidad de incluir un gran número de aislamientos, así como de elegir los mismos correctamente, en las pruebas de patogenicidad orientadas a la búsqueda de resistencia frente a la FET por parte de los programas de mejoramiento.

La estimación precisa del alcance de los síntomas de la FET es de fundamental importancia cuando se considera su utilización como estimador de la resistencia a la enfermedad en los programas de mejoramiento vegetal. Del presente trabajo surge que el desecamiento prematuro de las espigas es una función de la agresividad de los

aislamientos. Por ello, se deben tomar recaudos para evitar sobrestimar la enfermedad inducida en los genotipos de trigo. En este sentido, la cercana relación encontrada entre la disminución del PMG, el ABCPE y la estimación visual de la severidad sugiere que éstos pueden resultar indicadores útiles de la resistencia a la FET.

### **3.5. CONCLUSIONES**

La severidad de la enfermedad inducida por los aislamientos resultó un rasgo altamente variable y heredable.

El agrupamiento de los aislamientos observado en el Capítulo II no tuvo su correlato en los aspectos relacionados con su agresividad.

Los síntomas de la FET se dispersaron principalmente hacia la base de las espigas. El desecamiento prematuro de la espiga resultó ser una función de la agresividad de los aislamientos.

Tanto el ABCPE como la disminución del PMG resultan buenos estimadores de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*.

Los resultados obtenidos permiten afirmar la hipótesis planteada de que las poblaciones de *F. graminearum* que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan similares niveles de agresividad.

La relación existente entre los síntomas visualizados en los ensayos de campo, la capacidad de producción de micotoxinas por los aislamientos de *F. graminearum* y su presencia colonizando los tejidos vegetales serán analizados en profundidad en el Capítulo IV.

## **CAPÍTULO IV**

### **CAPACIDAD TOXICOGÉNICA Y PRODUCCIÓN DE TRICOTECENOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS DE *F. GRAMINEARUM* DE LA ARGENTINA Y SU RELACIÓN CON LA AGRESIVIDAD**



## CAPÍTULO IV

### Capacidad toxicogénica y producción de tricotecenos *in vivo* e *in vitro* de aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina y su relación con la agresividad

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos son capaces de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios con actividad biológica. Entre estos se incluyen los pigmentos y sustancias tóxicas para los microorganismos (antibióticos), las plantas (fitotoxinas) o los animales (micotoxinas) (Moss 1996).

Las micotoxinas son metabolitos persistentes y termoestables que, producidos en asociación con alimentos, piensos y forrajes, pueden causar problemas de salud en el hombre y en los animales en dosis frecuentemente bajas (Kendrick 1992). Las micotoxinas difieren en su estructura, biosíntesis y toxicidad y son producidas por hongos con ecologías diversas que van desde fitopatógenos obligados y endófitos a saprófitos con importancia en la post-cosecha y el almacenamiento. Algunas pueden incluso ser trasladadas a lo largo de la cadena de producción, finalizando asociadas a alimentos que nunca estuvieron en contacto con hongos contaminantes (Moss 1996).

Los primeros antecedentes conocidos de los efectos del consumo de alimentos contaminados con micotoxinas datan del año 430 a.C. y corresponden a la condición denominada ergotismo, cuyos síntomas son provocados por las micotoxinas producidas por el agente causal del cornezuelo del centeno, *Claviceps purpurea* (Kendrick 1992). Durante la Edad Media se conoció al ergotismo con el nombre de Fuego de San Antonio, siendo documentadas al menos 65 epidemias de la enfermedad entre 1581 y 1889.

El hecho que despertó el interés científico por el estudio de las micotoxinas en la modernidad ocurrió en 1960, cuando decenas de miles de pavos murieron en Inglaterra como consecuencia de una misteriosa enfermedad de etiología desconocida identificada como enfermedad "X". La patología fue tempranamente asociada a la ingesta de alimentos a base de maní contaminados con *Aspergillus flavus*. Se encontró que el causante de la toxicidad era un metabolito producido por este hongo por lo que la micotoxina fue denominada aflatoxina (Blount 1961; Sargeant *et al.* 1961). El descubrimiento de las aflatoxinas, y del efecto que provoca su ingesta por el hombre y los animales, incrementó el interés en el estudio de las micotoxinas y estimuló el desarrollo de métodos analíticos para la detección de estas sustancias en numerosos productos vegetales (Desjardins *et al.* 1993).

Los géneros fúngicos frecuentemente asociados a la producción de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, siendo los metabolitos de mayor importancia producidos por estos microorganismos las mencionadas aflatoxinas, las ocratoxinas, la patulina, los tricotecenos, la zearalenona (ZEA) y las fumonisinas (Moss 1996).

#### **4.1.1. Producción de micotoxinas por especies del género *Fusarium***

Dentro de los organismos fúngicos asociados a la contaminación de los alimentos con micotoxinas se destacan las especies pertenecientes al género *Fusarium*. El género incluye numerosos representantes considerados entre los patógenos vegetales más

importantes a nivel mundial así como saprófitos de un amplio rango de sustratos, cubriendo el espectro completo de actividad de los organismos productores de micotoxinas (Moss 1996). Entre los numerosos grupos de metabolitos producidos por especies del género se encuentran los tricotecenos, las fumonisinas, las neptazarinas y el ácido fusárico (Desjardins 1992) así como la micotoxina estrogénica ZEA (C.A.S.T., 1989).

Estos metabolitos han sido implicados en numerosas enfermedades desde su descubrimiento, entre ellas la ATA, la enfermedad de Urov o Kashin-Beck, el Akakabi-byo, y el cáncer esofágico en el hombre (Marasas *et al.* 1984). En los animales, por su parte, han sido documentados numerosos síndromes hemorrágicos, estrogénicos y eméticos, así como el rechazo de alimentos (Bennett y Klich, 2003; Forsyth *et al.* 1977).

El síndrome denominado ATA, caracterizado por la presencia de náuseas, vómitos y hemorragias, afectó a la población de Siberia durante la Segunda Guerra Mundial (especialmente entre 1942 y 1947). La enfermedad se desató cuando, como consecuencia de la guerra, la menor disponibilidad de mano de obra para la cosecha de los granos impidió que la misma se llevara a cabo durante el otoño. Cuando los granos fueron finalmente cosechados en primavera, estos resultaron altamente tóxicos. No fue hasta la década de 1970 que la epidemia de ATA fue relacionada con la presencia de micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium*, principalmente *F. poae* y *F. sporotrichioides* (Yagen y Joffe 1976).

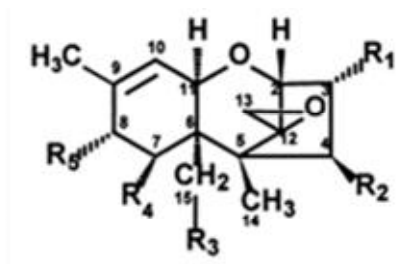
El Akakabi-byo o envenenamiento fúngico rojo (“Red mold poisoning”) se registró en algunas áreas rurales de Japón y el sur de Corea en la década de 1950. La micotoxina responsable fue aislada por primera vez en 1972 y denominada toxina roja (“Red Toxin”) (Morooka *et al.* 1972). Un año después, Vesonder *et al.* (1973) aislaron el mismo compuesto a partir de maíz contaminado con *F. graminearum*. Entre los síntomas ocasionados por la sustancia se encontraban el rechazo del alimento y la presencia de vómitos en cerdos por lo que la denominaron “vomitoxina”. Ese mismo año, Yoshizawa y Morooka (1973) dilucidaron la estructura química del compuesto, re-denominándolo 4-deoxinivalenol.

Los tricotecenos, sesquiterpenoides biosintetizados por la vía del farnesyl pirofosfato, constituyen el grupo más importante de metabolitos secundarios producidos por las especies del género. Su nombre deriva del género fúngico *Trichothecium*, productor del compuesto denominado tricotecina, descrito por primera vez por Freeman y Morrison en 1948 (citado por Mirocha *et al.* 2003).

Los tricotecenos son compuestos incoloros, mayormente cristalinos, solubles en solventes orgánicos polares y en agua, que se caracterizan por la presencia de un grupo olefínico en los carbonos 9 y 10 y un grupo epóxido en los carbonos 12 y 13 (Mirocha *et al.* 2003). De acuerdo con la presencia de distintos grupos funcionales en los carbonos de esta estructura básica, los tricotecenos se dividen en cuatro grupos (A-D), siendo los de los grupos A y B los producidos por las especies del género *Fusarium* relacionadas con la FET (Figura 16).

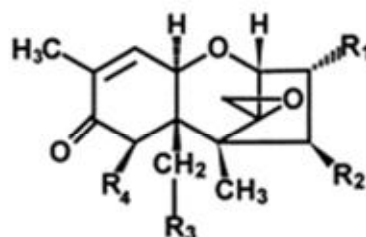
Los tricotecenos del grupo A, como las toxinas T-2 y HT-2, presentan una unión estérica en el C-8 y son usualmente producidos por *F. sporotrichioides* y *F. poae*. Los tricotecenos del grupo B, por su parte, presentan una cetona en el C-8 por lo que son denominados 8-ketotricotecenos. Dentro de este grupo se encuentran los tricotecenos DON y sus acetilados 3-ADON y 15-ADON; y NIV y su acetilado, el 4-acetil NIV (o fusarenona X) (Mirocha *et al.* 2003). La biosíntesis de estas micotoxinas se haya usualmente asociada a *F. graminearum* aunque Abramson *et al.* (1993) reportaron su

producción también por otras especies del género como *F. avenaceum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. poae*, y *F. sporotrichioides*.



**Tricotecenos del grupo A**

	R1	R2	R3	R4	R5
<b>Neosolaniol</b>	OH	OAc	OAc	H	OH
<b>HT-2</b>	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>T-2</b>	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>15-monoacetoxycirpenol</b>	OH	OH	OAc	H	H
<b>4,15-diacetoxycirpenol</b>	OH	OAc	OAc	H	H



**Tricotecenos del grupo B**

	R1	R2	R3	R4
<b>Deoxinivalenol (DON)</b>	OH	H	OH	OH
<b>3-Acetil-DON</b>	OAc	H	OH	OH
<b>15-Acetil-DON</b>	OH	H	OAc	OH
<b>Nivalenol (NIV)</b>	OH	OH	OH	OH
<b>Fusarenona-X (4-Acetil-NIV)</b>	OH	OAc	OH	OH

**Figura 16** – Estructura de los tricotecenos de los grupos A y B (adaptada de Langseth y Rundberget 1998).

Los tricotecenos poseen toxicidad directa adjudicada a la presencia del grupo epoxi en su molécula. Son potentes inhibidores de la síntesis protéica, siendo los tejidos más afectados las gónadas, los intestinos, la médula ósea y el tejido linfoide. Causan además daño físico a las membranas, resultando en la lisis celular (Miller *et al.* 2001). Inducen desórdenes hematológicos tales como neutropenia, trombopenia y anemia aplásica en humanos y animales, pero los estudios biológicos realizados no han detectado que sean precursores de cáncer (Lori y Rizzo 2007).

Dentro de este grupo, el tricoteceno más relevante es el DON. Este compuesto se ha detectado como contaminante de trigo, cebada, y maíz. Estos cultivos conforman las dos terceras partes de la producción mundial de cereales, constituyéndose el DON como la micotoxina más importante en el mundo en términos de exposición humana (Miller *et al.* 2001).

El DON altera el funcionamiento del sistema inmunológico tanto en animales como en seres humanos; tiene un efecto hemolítico sobre los eritrocitos; e inhibe la síntesis del ADN, del ARN y de las proteínas. Produce exclusivamente toxicidad aguda y no se acumula en el organismo. Los valores de  $DL_{50}$  oral son de aproximadamente 78 a 46 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal en ratones B6C3F1 y DDY respectivamente. Los síntomas de toxicidad aguda y subaguda de DON se caracterizan principalmente por vómitos (en cerdos ratas y ratones), rechazo del alimento (síndrome anoréxico), pérdida de peso y diarreas (Lori y Rizzo 2007).

#### 4.1.2. Producción de micotoxinas por *F. graminearum*

*Fusarium graminearum* es capaz de producir un importante número de micotoxinas, entre ellas las de mayor importancia son los tricotecenos DON y NIV y la micotoxina estrogénica ZEA. DON y NIV son las micotoxinas más frecuentemente encontradas en trigo infectado por *Fusarium* (McCormick 2003).

De acuerdo con el patrón de tricotecenos producidos, los aislamientos de *F. graminearum* pueden pertenecer a tres quimiotipos distintos: el quimiotipo *Ia*, productor de DON y 3-ADON; el *Ib*, caracterizado por la producción de DON y 15-ADON; y el *II*, que produce NIV y fusarenona X (Ichinoe *et al.* 1983; Moos y Thrane 2004). La variación en el quimiotipo es importante para determinar la aceptabilidad de los métodos utilizados en el análisis del contenido de toxinas en alimentos para el hombre o los animales (Ramírez *et al.* 2006).

Los tricotecenos son sintetizados mediante una compleja ruta metabólica que involucra una serie de oxigenaciones, isomerizaciones y esterificaciones. La mayor parte de los genes involucrados en la biosíntesis se localizan en un clúster de al menos 10 genes que incluyen los de la tricodieno sintasa (*Tri5*), la P450 oxigenasa (*Tri4* y *Tri11*), una acetiltransferasa (*Tri3* y *Tri7*), factores de transcripción (*Tri6* y *Tri10*), una bomba de eflujo de toxina (*Tri12*) y dos proteínas hipotéticas (*Tri8* y *Tri9*) (Lee *et al.* 2002). La identificación de los genes responsables de las distintas etapas en la ruta metabólica de síntesis de tricotecenos ha permitido el desarrollo de ensayos de PCR que permiten diferenciar rápida y fácilmente los posibles genotipos implicados en la producción de toxinas.

Se han reportado diferencias en la distribución geográfica de los quimiotipos de *F. graminearum*. Mientras que en EE.UU. y Canadá sólo se ha encontrado la presencia de quimiotipos DON (Miller *et al.* 1983), quimiotipos tanto DON como NIV han sido hallados en Japón (Yoshizawa y Jin 1995), Italia (Logrieco *et al.* 1988), Sudáfrica (Sydenham *et al.* 1991) y Australia (Blaney y Dodman 1988).

Los estudios realizados para determinar la composición de los quimiotipos de *F. graminearum* en la Argentina resultan controversiales y el patrón de producción de micotoxinas por parte de los mismos permanece sin ser aclarado. Numerosos trabajos realizados en el país han demostrado la prevalencia de quimiotipos DON y sus acetilados en la región triguera argentina (Dalcero *et al.* 1997; Faifer *et al.* 1990; Ramírez *et al.* 2006). Sin embargo, también son numerosos los estudios en que se han



hallado aislamientos pertenecientes al quimiotipo NIV (Álvarez *et al.* 2007; Fernández Pinto *et al.* 2008; Lori *et al.* 1992; Reynoso *et al.* 2011; Sampietro *et al.* 2011). Los antecedentes demostrarían que, si bien el quimiotipo predominante en los aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina aparenta ser el DON, existe el potencial para eventuales contaminaciones de granos con NIV.

#### 4.1.3. Rol de las toxinas en la agresividad de *F. graminearum*

En las poblaciones de *F. graminearum*; diferencias cualitativas y cuantitativas en la producción de enzimas y micotoxinas, principalmente del grupo de los tricotecenos, serían las posibles causas de la gran variabilidad presente en la agresividad (Miedaner *et al.* 2000). Una posible correlación entre la agresividad de los aislamientos y la producción de DON por parte de *F. graminearum* y *F. culmorum* ha sido reportada (Desjardins *et al.* 1996; Wang *et al.* 2006). Sin embargo, el rol de estos metabolitos en el desarrollo de la FET no está claro (Cumagun *et al.* 2004).

La actividad fitotóxica de los tricotecenos, y del DON entre ellos, fue identificada durante los primeros años de su estudio (Miller *et al.* 2001). Estos compuestos pueden causar clorosis, necrosis y marchitamientos (McCormick 2003) y jugarían un papel importante en la patogenicidad. Se ha propuesto que serían traslocados en los tejidos de la planta antes de que se produzca el crecimiento del hongo y actuarían en detrimento de la síntesis proteica del vegetal suprimiendo o retrasando la activación de los mecanismos de defensa de la planta. La disminución en la producción de estas micotoxinas no influiría en la capacidad de un aislamiento para infectar el trigo o el maíz, pero podría afectar la progresión de la infección debido a la disminución de su agresividad (Proctor *et al.* 1995; 1997).

La enzima tricodieno sintasa cataliza la ciclización del *trans*, *trans*-farnesyl pirofosfato a tricodieno, que es la molécula que sirve de precursor común a todos los tricotecenos (Desjardins *et al.* 1993). Esta enzima es codificada por el gen *Tri5*. En cepas de *F. graminearum* la inactivación del gen *Tri5* alteró la capacidad de las cepas para infectar la espiga de maíz disminuyendo significativamente la agresividad de los transformantes (Proctor *et al.* 1995; Desjardins *et al.* 1996; Harris *et al.* 1999).

Si, como demostrarían los experimentos descritos, la producción de tricotecenos resultara un factor de agresividad importante para el desarrollo de la FET causada por *F. graminearum*, se abriría la posibilidad de desarrollar cultivares de trigo resistentes a la acumulación de toxinas que pudieran, a su vez, presentar un mejor comportamiento frente a la enfermedad (McCormick 2003). Sin embargo, existen en la bibliografía referencias en las que los autores no han encontrado correlación entre la ocurrencia de la FET y la producción de tricotecenos, o ésta ha sido inconsistente (Adams y Hart 1989; Arseniuk *et al.* 1999; Liu *et al.* 1997; Walker *et al.* 2001). A pesar de que estos trabajos no excluyen la posibilidad de que el DON sea un factor de virulencia en el desarrollo de la FET, la inconsistencia de los resultados obtenidos impide corroborar que su producción sea un requerimiento esencial para el desarrollo de la enfermedad.

En la Argentina, los estudios respecto de la relación entre la inducción de síntomas en las espigas de trigo, la acumulación de toxinas en los granos del cereal y la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *F. graminearum* resultan escasos. Álvarez *et al.* (2010) realizaron ensayos en el país para la determinación de la relación existente entre estos parámetros. Los autores no encontraron la existencia de correlación significativa entre la cantidad de tricotecenos producidos por los aislamientos y su

agresividad. Copia (2012), por su parte, evaluó la relación existente entre el desarrollo de los síntomas de la FET en distintos cultivares y líneas de trigo infectadas naturalmente e inoculadas con un aislamiento de *F. graminearum*, con resultados variables. Durante el primero de dos años de ensayo con infección natural, el autor no observó correlación significativa entre la severidad de la enfermedad y el contenido de DON pero sí lo hizo en el segundo año y en dos ensayos con inoculación artificial por aspersión.

En este contexto, la determinación del quimiotipo, de la capacidad de producción de micotoxinas y de la relación existente entre su acumulación y la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina, resultan de singular importancia. El estudio y el reconocimiento de la relación existente entre la capacidad de los aislamientos de inducir los síntomas de la FET y la acumulación de micotoxinas en los granos permitirán obtener información de extrema utilidad para el desarrollo de planes de mejoramiento varietal orientados a mejorar el comportamiento de los genotipos de trigo frente a la enfermedad.

Durante el desarrollo del presente capítulo se buscará poner a prueba las hipótesis de (i) que las poblaciones de *F. graminearum* que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan niveles de capacidad toxicogénica similares y (ii) que la agresividad de estos aislamientos está directamente relacionada con la producción de DON de las mismas. Para ello se plantearon como objetivos (i) cuantificar la capacidad de producción de tricotecenos de los aislamientos de *F. graminearum* provenientes de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires, y (ii) correlacionar la acumulación de tricotecenos con la agresividad y la capacidad de colonización de la espiga por los aislamientos.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Análisis de los quimiotipos de *F. graminearum*

A partir de la colección de 112 aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina se llevó adelante el análisis de los quimiotipos DON y NIV mediante la PCR multiplex desarrollada por Quarta *et al.* (2006) con los primers 3551H/4056H (Bakan *et al.* 2002; Quarta *et al.* 2006) y Tri7F340/Tri7R965 (Quarta *et al.* 2005). La secuencia de los primers utilizados y sus genes objetivo se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7** – Primers utilizados para el análisis de los quimiotipos de 112 aislamientos de *Fusarium graminearum* de la Provincia de Buenos Aires mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex.

Quimiotipo	Primer	Secuencia (5' a 3')	Gen
DON	3551H	ACT TTC CCA CCG AGT ATT TT	<i>Tri5</i>
	4056H	CAA AAA CTG TTG TTC CAC TGC C	
NIV	Tri7F340	ATC GTG TAC AAG GTT TAC G	<i>Tri7</i>
	Tri7R965	TTC AAG TAA CGT TCG ACA AT	

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL, conteniendo 5-10 ng de ADN genómico, 1X buffer de reacción (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl pH 9 a 25°C, 1% Triton X-100 sin Mg), 1 unidad de T-plus ADN polimerasa (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN- Tandil), 0,1 µM de cada uno de los primers

(FAGOS/Ruralex, Argentina), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP y 1,5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ . El ciclo de PCR utilizado consistió en: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 m seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C (30 s), hibridación a 53°C (30 s), extensión a 72°C (1 m) y finalizó con un período de extensión a 72°C (10 m). Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Los productos de reacción se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (p/v) conteniendo 0,2 mg  $\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio en buffer trisborato-EDTA. Las corridas se realizaron a una corriente de 90 voltios, los fragmentos de ADN obtenidos se visualizaron bajo luz UV y el tamaño de los mismos fue estimado por comparación con las bandas generadas por un marcador molecular de ADN de 1 kb (Highway Molecular Biology- InBio- UNICEN- Tandil). Los geles se visualizaron con el analizador de imágenes GeneGenius (Syngene, USA), utilizando el programa informático GeneSnaps para la toma de fotografías, y los programas informáticos GeneTools y GeneDirectory para el análisis de las mismas.

En cada una de las reacciones de amplificación se incluyó un control negativo sin ADN así como controles positivos para los quimiotipos DON y NIV.

#### 4.2.2. Producción de deoxinivalenol *in vivo* e *in vitro*

Se evaluó la producción *in vivo* e *in vitro* de DON en 14 de los 112 aislamientos de *F. graminearum* cuya agresividad se analizó en ensayos de campo llevados a cabo durante dos años. Para la selección de los aislamientos, y buscando que los mismos fueran representativos de los distintos grupos de agresividad construidos, se repitieron los análisis de severidad a los 21 dpi, reducción del PMG relativo y heredabilidad según Fehr (1987) llevados a cabo con los 112 representantes de *F. graminearum* (véase el Capítulo III).

La cuantificación de la producción de DON por parte de las cepas de *F. graminearum* se realizó mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (o ELISA, acrónimo inglés de *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando el inmunoensayo enzimático para el análisis cuantitativo de deoxinivalenol RIDASCREEN® FAST DON (R-Biopharm) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Gosman *et al.* 2005, 2007).

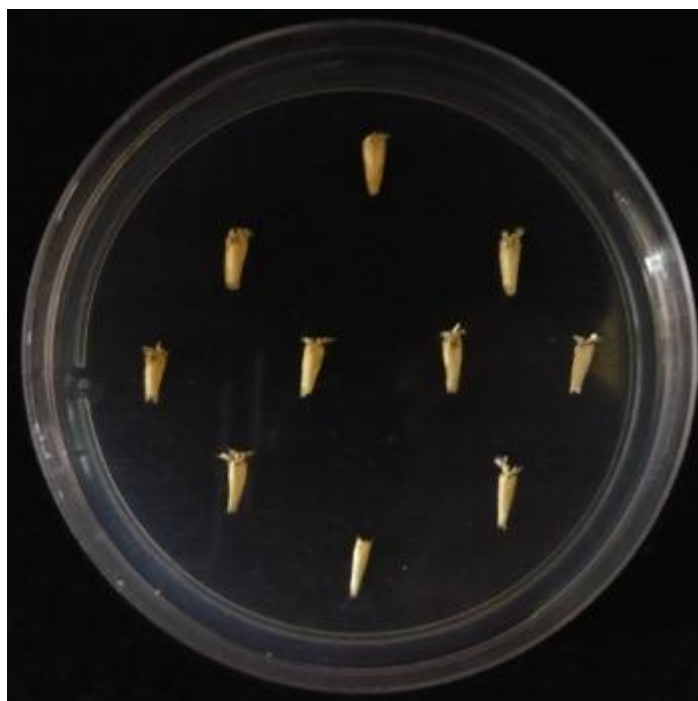
Para la cuantificación de la producción de DON *in vivo* se utilizaron los granos obtenidos de la trilla de las espigas provenientes de los ensayos de campo, molidos y pesados para cada uno de los bloques de los tratamientos a analizar. Como control no contaminado fueron utilizados los granos de los testigos de los ensayos de campo.

Para la determinación de la producción de DON *in vitro*, por su parte, los aislamientos de *F. graminearum* se cultivaron por triplicado en frascos Erlenmeyer conteniendo 25 g de arroz blanco pulido y 20 g de agua destilada (humedad del 80%), previamente esterilizados. Los frascos con el sustrato sólido se sembraron con un disco de 5 mm de diámetro de una colonia de *F. graminearum* de 7 días de desarrollo en medio de cultivo APG. Como control negativo se utilizaron 3 frascos Erlenmeyer con el sustrato sólido preparado como fuera descrito previamente e inoculados con discos de APG. Los cultivos fueron incubados en estufa a  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  en la oscuridad durante 28 días, secados en estufa con circulación de aire hasta peso constante, molidos y pesados para la determinación del contenido de DON.

Para la cuantificación del DON mediante ELISA, el total de las muestras de grano contaminado por *F. graminearum* provenientes de los ensayos de campo (producción de DON *in vivo*) y de los cultivos desarrollados sobre arroz (producción de DON *in vitro*) se diluyeron a razón de 1:20 (p/v) en agua destilada y se homogeneizaron en agitador magnético durante 3 min. El extracto obtenido fue filtrado a través de un papel de filtro Whatman n. 1 y se tomaron alícuotas de 50 µL por micropozo de la placa para su análisis en el test. La absorbancia fue medida a 450 nm con un detector multimodo para microplacas Beckman Coulter dtx-880. Los datos de absorbancia obtenidos se convirtieron a concentración de DON con el programa informático RIDA® SOFT Win, tomando como referencia la curva de calibración generada a partir de los estándares de DON provistos en el kit.

#### 4.2.3. Análisis de la expansión de *F. graminearum* en el raquis desde el punto de inoculación en la espiga

En las espigas inoculadas con los aislamientos seleccionados para evaluar la capacidad toxicogénica se evaluó, además, la expansión de *F. graminearum* en el raquis. Para ello, cada una de las espigas inoculadas con estos aislamientos fue trillada manualmente, los raquis se desinfectaron superficialmente sumergiéndolos primero en una solución de alcohol etílico 70° (1 m), luego en una solución de NaClO comercial (55 g de Cl L<sup>-1</sup>) al 5% (1 m) y finalmente en agua destilada estéril (5 m). Los raquis estériles fueron separados en sus partes componentes (artejos), sembrados en cajas de Petri conteniendo APG al 2% (p/v) adicionado con un 0,6% (p/v) de PCNB y 0,25% (p/v) de cloranfenicol, e incubados en la oscuridad a 25°C ± 2°C durante 5 días.



**Figura 17** – Sembrado en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) de los artejos de la porción apical del raquis de una espiga de trigo inoculada con un aislamiento de *Fusarium graminearum*.

La siembra de los artejos en el medio de cultivo se realizó respetando el orden establecido para las espiguillas en los ensayos de campo. Así, los artejos

correspondientes a las espiguillas inoculadas fueron identificados como +0, el correspondiente a la espiguilla central superior, y -0, el de la espiguilla central inferior. El resto de los artejos fueron numerados con números positivos y negativos sucesivos de acuerdo con su posición relativa respecto de los correspondientes a los PI (Figura 17). Como control negativo fueron utilizados los raquis de las espigas pertenecientes a los tratamientos testigo de los ensayos de campo.

Transcurridos los 5 días de incubación se realizó el registro de los datos de infección del raquis. El porcentaje de infección se determinó considerando el número de artejos con desarrollo de colonias de *F. graminearum* sobre el total de artejos de la espiga. Los datos se registraron respetando el orden establecido en la siembra.

Para evitar los falsos positivos, la infección de los artejos por parte de *F. graminearum* se confirmó mediante comprobación microscópica al azar de la morfología de las colonias obtenidas en el medio APG y de los macroconidios obtenidos en medio CLA y/o mediante PCR con los primers FG16N F/R.

#### **4.2.4. Análisis estadístico**

Los datos de agresividad, producción de tricotecenos y capacidad de expansión en la espiga por parte de *F. graminearum* se estudiaron mediante ANOVA y se establecieron los correspondientes coeficientes de correlación. Para los parámetros producción de DON *in vivo*, PMG y desecamiento prematuro de la espiga se utilizaron como unidad experimental los bloques de inoculación. Las medias fueron comparadas usando Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Los datos de agresividad y expansión en el raquis fueron recogidos en base a una escala proporcional (valores entre 0 y 1) a pesar de que fueron analizados como porcentaje y, como consiguiente, su distribución no es binomial si no continua. Para estabilizar la varianza de estos datos y ajustarlos a una distribución normal, los mismos fueron transformados usando la función arcoseno de la raíz cuadrada de la probabilidad (Sokal y Rohlf 1995).

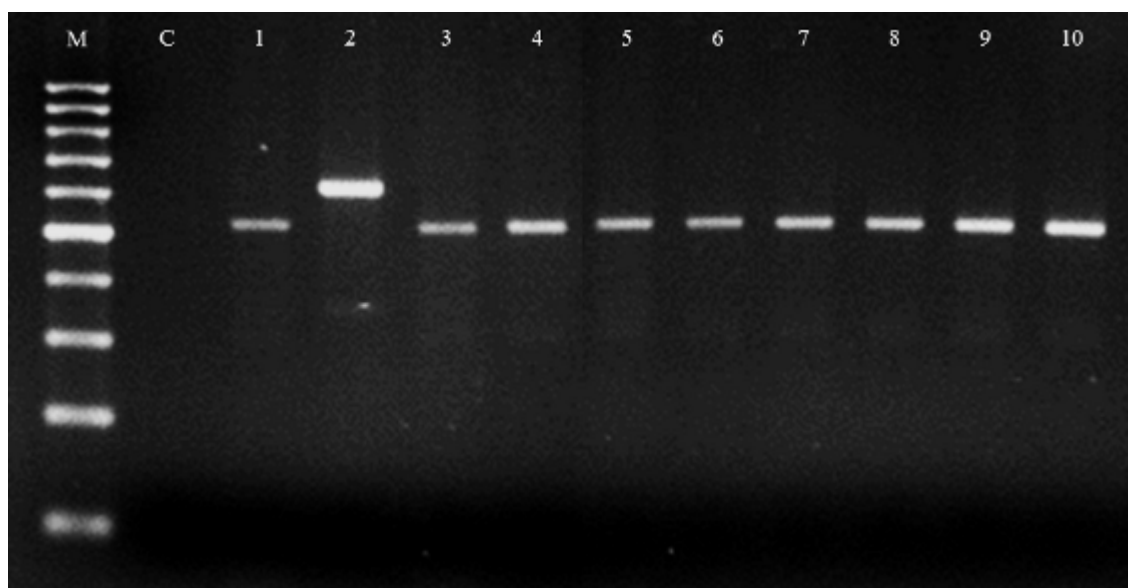
Para todas las combinaciones de parámetros se llevaron adelante análisis de correlación de Pearson con  $\alpha = 0,05$ . Con esta metodología se compararon, sobre la base de los resultados promedios obtenidos para cada bloque: (i) la severidad de los síntomas de la FET 21 dpi con el PMG relativo; (ii) la severidad 21 dpi con la acumulación de DON *in vivo*; (iii) la severidad 21 dpi con el porcentaje de artejos colonizados; (iv) el porcentaje de artejos colonizados con el PMG relativo; y (v) el porcentaje de artejos colonizados y la producción de DON *in vivo*. Sobre la base de los resultados promedio por tratamiento, por su parte, fueron comparados mediante análisis de correlación de Pearson con  $\alpha = 0,05$ : (i) la severidad de los síntomas de la FET 21 dpi con la acumulación de DON *in vitro*; (ii) el porcentaje de artejos colonizados con la producción de DON *in vitro*; y (iii) la producción de DON *in vivo* e *in vitro*. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático Statistix v.8.

### **4.3. RESULTADOS**

#### **4.3.1. Análisis de los quimiotipos de *F. graminearum***

Los quimiotipos DON/NIV de los aislamientos de *F. graminearum* procedentes de la región triguera argentina fueron caracterizados mediante un set de primers de

multiplex PCR. Para ello se modificaron las condiciones de reacción originales de Quarta *et al.* (2006) reduciendo el volumen de reacción de 50  $\mu$ L a 25  $\mu$ L y manteniendo las concentraciones de los reactivos. La corrida electroforética de los fragmentos resultantes permitió observar en los aislamientos de quimiotipo DON la presencia de una banda de 525 pb, mientras que para los aislamientos de quimiotipo NIV, el tamaño de la banda observada fue de 625 pb (Figura 18). Del análisis surgió que los 112 aislamientos de *F. graminearum* procedentes de las 28 localidades consideradas pertenecen al quimiotipo DON.



**Figura 18** - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex para determinación de los quimiotipos de *Fusarium graminearum*. La calle M corresponde al marcador molecular de 100-1000 pb, la C al control sin ADN, la 1 al control positivo de *Fusarium graminearum* de quimiotipo deoxinivalenol (DON), la 2 al control positivo de *F. graminearum* de quimiotipo nivalenol (NIV), las 3 - 10 a aislamientos de *F. graminearum* obtenidos en el presente trabajo, todos ellos de quimiotipo DON.

#### 4.3.2. Selección de aislamientos para el análisis de deoxinivalenol *in vivo* e *in vitro* y de la expansión de *F. graminearum* en la espiga

De los 112 aislamientos de *F. graminearum* analizados en su agresividad en ensayos de campo, 14 fueron seleccionados para llevar adelante el análisis de la producción de micotoxinas y de la expansión del patógeno en la espiga. El valor de la heredabilidad de la severidad de los síntomas inducidos en las espigas de trigo por los 14 aislamientos seleccionados fue  $H^2 = 0,96$ . En función del alto valor alcanzado, los resultados obtenidos para la severidad, la reducción del PMG, la producción de micotoxinas *in vivo* y la colonización del raquis fueron promediados para ambos años de ensayos a campo y los valores medios se presentan en la Tabla 8.

En paralelo con lo visto para los 112 aislamientos de *F. graminearum* probados en dos años de ensayos de campo (véase Capítulo III), los 14 aislamientos seleccionados demostraron la existencia de diferencias significativas para la severidad de la enfermedad inducida ( $F = 7,34$ ;  $p < 0,01$ ), con aproximadamente un 30% de las espigas con síntomas de desecamiento prematuro, y la reducción del PMG relativo al tratamiento control sin inocular ( $F = 5,31$ ;  $p < 0,01$ ). Más aun, existió una estrecha

correlación entre la severidad de los síntomas de la FET y el PMG relativo ( $r = -0,9003$ ;  $p < 0,01$ ).

**Tabla 8** - Resultados de agresividad en ensayos de campo, producción de micotoxinas y expansión de la infección del raquis por *Fusarium graminearum*. Los resultados corresponden a 14 aislamientos del patógeno de la Provincia de Buenos Aires.

Aislamiento	Severidad 21 dpi (%)	PMG relativo (%)	DON <i>in vivo</i> (ppm)	DON <i>in vitro</i> (ppm)	Artejos infectados (%)
SP1	50 <sup>a</sup>	65 <sup>c</sup>	31,3 <sup>a</sup>	227,8 <sup>abc</sup>	86 <sup>a</sup>
LF2	35 <sup>b</sup>	70 <sup>abc</sup>	16,2 <sup>bc</sup>	221,9 <sup>abc</sup>	69 <sup>abcd</sup>
BA15	28 <sup>b</sup>	79 <sup>ab</sup>	19,1 <sup>ab</sup>	316,9 <sup>abc</sup>	83 <sup>ab</sup>
BA14	27 <sup>b</sup>	82 <sup>ab</sup>	21,2 <sup>ab</sup>	238,2 <sup>abc</sup>	86 <sup>a</sup>
LH11	26 <sup>b</sup>	75 <sup>abc</sup>	21,4 <sup>ab</sup>	366,7 <sup>a</sup>	78 <sup>abc</sup>
30A3	25 <sup>bc</sup>	91 <sup>ab</sup>	14,3 <sup>bc</sup>	328,3 <sup>abc</sup>	69 <sup>abcd</sup>
LF1	25 <sup>bc</sup>	86 <sup>ab</sup>	16,2 <sup>bc</sup>	316,9 <sup>abc</sup>	77 <sup>abc</sup>
MR46	23 <sup>bc</sup>	80 <sup>ab</sup>	14,8 <sup>bc</sup>	373,0 <sup>a</sup>	81 <sup>abc</sup>
LH7	22 <sup>bcd</sup>	84 <sup>ab</sup>	14,7 <sup>bc</sup>	311,0 <sup>abc</sup>	80 <sup>abc</sup>
GA1	14 <sup>bcd</sup>	90 <sup>ab</sup>	13,0 <sup>bc</sup>	140,6 <sup>bc</sup>	60 <sup>bcd</sup>
MR40	14 <sup>bcd</sup>	87 <sup>ab</sup>	11,9 <sup>bc</sup>	357,9 <sup>ab</sup>	72 <sup>abcd</sup>
MR25	11 <sup>bcd</sup>	92 <sup>ab</sup>	12,7 <sup>bc</sup>	126,5 <sup>c</sup>	71 <sup>abcd</sup>
MR4	10 <sup>cd</sup>	91 <sup>ab</sup>	9,4 <sup>bc</sup>	244,7 <sup>abc</sup>	57 <sup>cd</sup>
MR18	6 <sup>d</sup>	94 <sup>a</sup>	4,5 <sup>c</sup>	177,2 <sup>abc</sup>	48 <sup>d</sup>

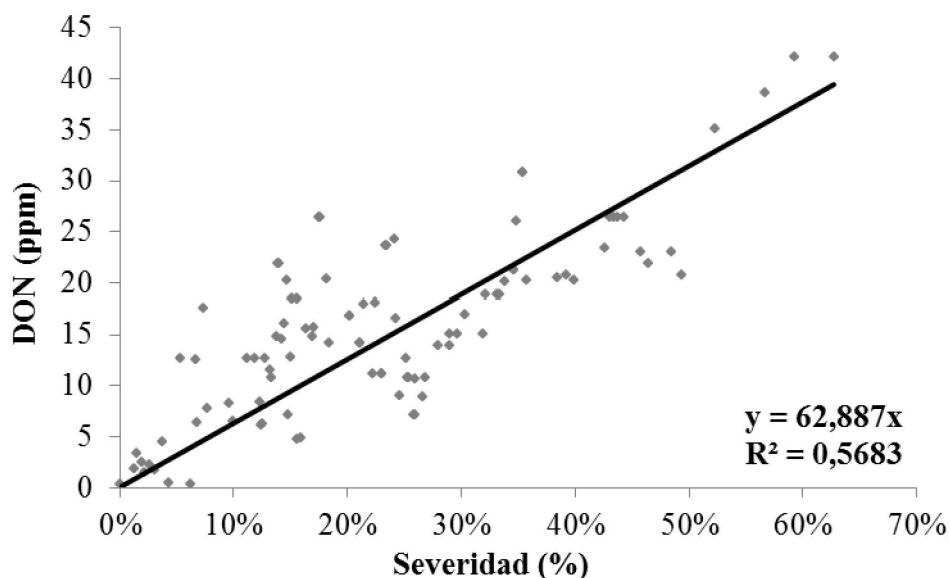
Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.3.3. Producción de deoxinivalenol *in vivo* e *in vitro*

Los aislamientos difirieron en su capacidad toxicogénica (Tabla 8). La producción de DON en los granos provenientes de los ensayos de campo (*in vivo*) presentó diferencias significativas entre los aislamientos ( $F = 5,91$ ;  $p < 0,01$ ). Los valores promedio oscilaron entre 4,5 ppm ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) para el aislamiento MR18 y 31,3 ppm para el aislamiento SP1. Diferencias significativas entre los aislamientos fueron también encontradas en la capacidad de producción de DON *in vitro* sobre arroz estéril de HR 80% ( $F = 4,33$ ;  $p < 0,01$ ). Los valores de concentración de la toxina encontrados en estos casos oscilaron entre 126,5 ppm para el aislamiento MR25 y 373 ppm para el aislamiento MR46. No se verificó la presencia de la toxina en los tratamientos testigo de los análisis de producción *in vitro* o *in vivo*.

Existió una estrecha correlación entre la severidad de los síntomas ocasionados por los aislamientos en los ensayos de campo y la producción de DON *in vivo* ( $r = 0,9073$ ;  $p < 0,01$ ), pero no entre la severidad y la cantidad de micotoxina acumulada *in vitro* ( $r = 0,3133$ ). En forma similar, no se verificó la presencia de correlaciones significativas para la producción de DON *in vitro* e *in vivo* ( $r = 0,1440$ ).

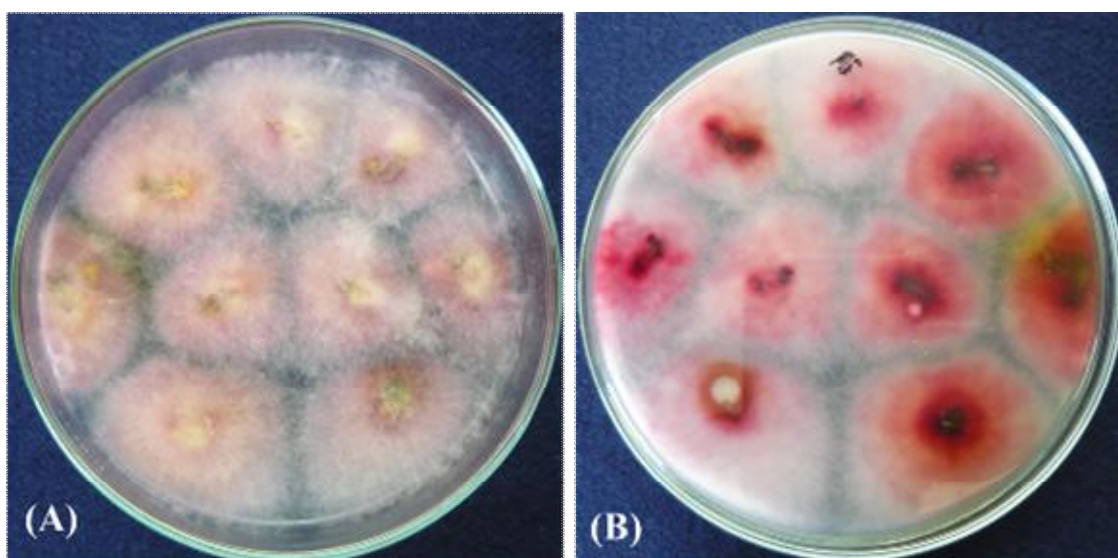
Según surge del análisis de regresión, la relación entre la severidad de la FET y la acumulación de DON en los granos infectados (*in vivo*) resultó lineal y de signo positivo ( $R^2 = 0,5683$ ) (Figura 19).



**Figura 19** - Análisis de regresión entre la severidad de los síntomas de Fusariosis de la Espiga a los 21 días post inoculación y la concentración de deoxinivalenol (DON) en los granos. Los resultados fueron obtenidos de la inoculación de 14 aislamientos de *Fusarium graminearum* de la Provincia de Buenos Aires en espigas de plantas de trigo en dos años de ensayos de campo.

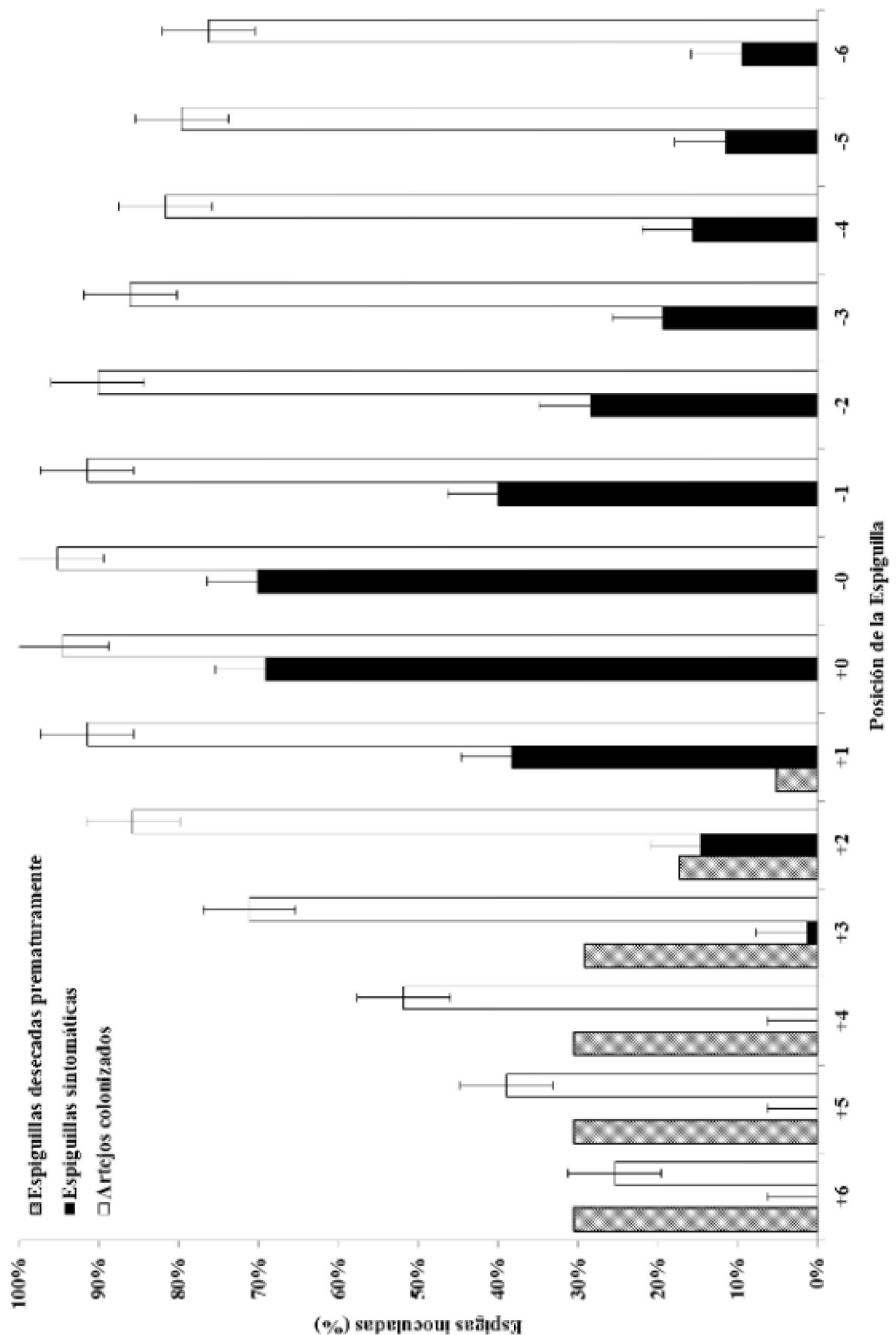
#### 4.3.4. Análisis de la expansión de *F. graminearum* en la espiga de trigo desde el punto de inoculación

En más del 90% de los raquis analizados se observó la presencia del patógeno en los artejos correspondientes a las espiguillas inoculadas en los ensayos de campo (+0 y -0) (Figuras 20 y 21). Los aislamientos difirieron significativamente en su capacidad de colonización ( $F = 7,22$ ;  $p < 0,01$ ), con valores de entre el 45,5% y el 89% de los artejos colonizados para los aislamientos MR18 y BA14, respectivamente (Tabla 8).



**Figura 20** - Vista superior (A) e inferior (B) de un cultivo de artejos de la porción apical del raquis de una espiga de trigo inoculada con un aislamiento de *Fusarium graminearum* en medio de cultivo agar papa glucosado (APG).





**Figura 21** - Porcentaje de espigas de plantas de trigo inoculadas a campo con 14 aislamientos de *Fusarium graminearum* con síntomas visibles de Fusariosis de la Espiga (FET) y de desecamiento prematuro a los 21 días post inoculación (dpi) y con artejos colonizados. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del punto de inoculación (PI) y los negativos aquellas ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente).

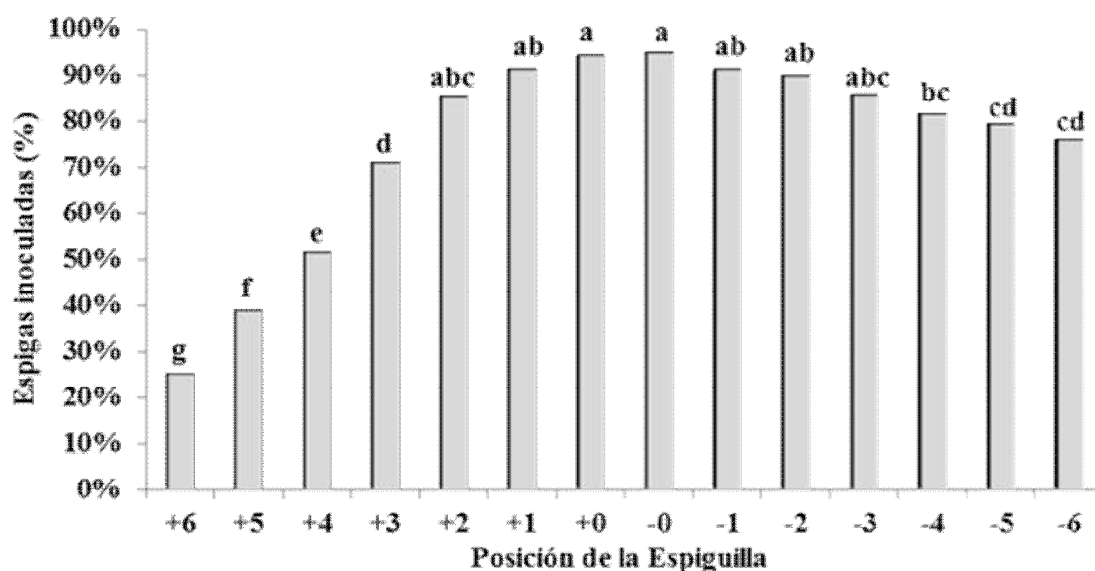
En todos los tratamientos analizados y para todas las pares espiguilla-artejo considerados el porcentaje de presencia del patógeno en el raquis superó ampliamente la presencia de síntomas visibles de la FET a campo (Figura 21).

El porcentaje de colonización resultó superior incluso al porcentaje de espigas con síntomas de desecamiento prematuro en cada uno de los pares espiguilla-artejo, excepto en el caso de la posición más distal (+6).

A pesar de que para las espigas pertenecientes a los tratamientos considerados en ningún caso fue posible observar visualmente la presencia de síntomas más allá de la espiguilla ubicada a +3, la presencia del patógeno se verificó en los artejos de correspondientes a la espiguilla apical en más del 25% de las espigas.

La tendencia de la distribución de los síntomas desde el PI hacia la base de las espigas inoculadas verificada en el análisis de la dispersión de los síntomas de la FET fue observada también para la expansión de la infección de los artejos del raquis (Figura 22).

Los mayores porcentajes de infección se encontraron en los artejos pertenecientes a las espiguillas inoculadas. No existieron diferencias significativas entre la colonización de los artejos pertenecientes a los PI y a las dos espiguillas ubicadas inmediatamente por encima (+1 y +2) y por debajo (-1 y -2) de los mismos. La tendencia basípeta en la dispersión del patógeno pudo verificarse a partir de los artejos ubicados a +3 y -3. Desde este punto en adelante, la caída en el porcentaje de artejos infectados fue mucho más pronunciada para aquellos ubicados hacia arriba que para aquellos ubicados por debajo del PI, alcanzándose finalmente valores de 76% de infección en el artejo -6 y de 25% en el artejo +6.



**Figura 22** - Porcentaje de espigas de plantas de trigo inoculadas con 14 aislamientos *Fusarium graminearum* con los artejos por encima y por debajo del punto de inoculación (PI) infectados por el patógeno. Los números positivos representan las espiguillas ubicadas por encima del PI y los negativos las ubicadas por debajo del PI (ej. +0 y -0 corresponden a las espiguillas inoculadas y +1 y -1 las espiguillas directamente encima y debajo de estas, respectivamente). Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos ( $\alpha = 0,05$ ).

El porcentaje de infección de los artejos de las espigas inoculadas se vio correlacionado con la severidad de los síntomas de la FET ( $r = 0,7106$ ;  $p < 0,01$ ) y, en menor medida, con el PMG relativo ( $r = -0,6413$ ;  $p < 0,05$ ). En cuanto a la producción de micotoxinas, la infección de los artejos por *F. graminearum* estuvo muy correlacionada con la cantidad de DON en los granos de trigo ( $r = 0,8081$ ;  $p < 0,01$ ) pero no se observó la misma respuesta cuando se analizó la producción de DON *in vitro* ( $r = 0,4835$ ).

#### **4.4. DISCUSIÓN**

Debido a las diferencias toxicológicas entre DON y NIV (Desjardins y Proctor 2007), la determinación de los quimiotipos de *F. graminearum* presentes en distintas regiones geográficas resulta de fundamental importancia para la predicción de los riesgos de ocurrencia de contaminaciones en los alimentos.

En la Argentina existe controversia respecto del quimiotipo que prevalece en las poblaciones de *F. graminearum*. La mayoría de los trabajos realizados con aislamientos del patógeno en el país sugieren que el tricoteceno predominante es el DON, sin embargo existiría potencial para la contaminación con NIV. Trabajando con muestras de trigo pan provenientes de la región triguera argentina, González *et al.* (2008) encontraron la presencia de algunas muestras que presentaron pequeñas cantidades de NIV. Tanto Lori *et al.* (1992) como Fernández Pinto *et al.* (2008), por su parte, encontraron la presencia de cepas que presentaron la capacidad de producir NIV e incluso DON y NIV en forma conjunta trabajando con aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de muestras de trigo.

En el presente trabajo se analizaron 112 aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de 28 localidades de la Provincia de Buenos Aires para determinar su capacidad de producir tricotecenos. Todos los aislamientos fueron caracterizados como productores exclusivamente de DON sobre la base de la amplificación de fragmentos específicos de los genes *Tri5* y *Tri7*, relacionados con la producción de tricotecenos. El gen *Tri5* codifica para la tricodieno sintasa, la primera enzima específica de la biosíntesis de tricotecenos, mientras que un gen *Tri7* funcional codifica la 4-O-acetiltransferasa, necesaria para la producción de NIV (Quarta *et al.* 2006).

Este resultado concuerda con análisis previos de la variabilidad en los quimiotipos de aislamientos *F. graminearum* de la Argentina, que han encontrado que el principal contaminante presente en los granos es DON. Dalcero *et al.* (1997) encontraron que el único contaminante fúngico presente en muestras de trigo fue DON. Similares resultados fueron obtenidos por Lori *et al.* (2003) quienes sólo encontraron presencia de DON como contaminante de 147 muestras de trigo fideos obtenidas en dos campañas de cultivo.

Trabajando con aislamientos de *F. graminearum* obtenidos de muestras de trigo, Ramírez *et al.* (2006) encontraron que el 90% produjeron exclusivamente DON, mientras que el 10% restante produjo DON y 3-ADON. En contraposición, Álvarez *et al.* (2009) hallaron tanto quimiotipos *Ia* como *Ib* entre 144 aislamientos, siendo el primero el que prevaleció. Reynoso *et al.* (2011), por su parte, encontraron que de un grupo de 116 aislamientos de *F. graminearum* testeados en su capacidad de producción de toxinas *in vitro*, 107 fueron capaces de producir DON y 15-ADON, mientras que los 9 aislamientos restantes produjeron exclusivamente DON.

Una mayor fitotoxicidad de DON sobre NIV hacia el trigo (Desjardins 2006) podría ser la causa de la prevalencia del quimiotipo *I* hallada en los aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina. En maíz, Sampietro *et al.* (2011) encontraron una importante presencia de aislamientos de *F. graminearum* de quimiotipo NIV, atribuida a potenciales diferencias de los aislamientos en la preferencia de los distintos hospedantes. Estos resultados sugieren que el potencial toxicogénico presente en las poblaciones de *F. graminearum* en la Argentina es complejo y abren la posibilidad de la ocurrencia de variaciones significativas en el rango de contaminación con micotoxinas de los cereales.

Del total de aislamientos analizados en su agresividad en ensayos de campo, 14 fueron seleccionados para llevar adelante el análisis de la producción de micotoxinas tanto *in vivo* como *in vitro*. Éstos fueron analizados en los parámetros considerados para la determinación de la variabilidad en la agresividad llevada adelante en el Capítulo III. Del mismo modo que para el grupo completo, la heredabilidad de la severidad de los síntomas inducidos por los aislamientos seleccionados indicó que la mayor parte de la variabilidad presente fue resultado de diferencias en el genotipo de los mismos y no de variaciones en el ambiente. Dentro del grupo de 14 aislamientos fue posible, a su vez, verificar la existencia de diferencias significativas tanto para la severidad de la enfermedad inducida como para la reducción del PMG relativo al tratamiento control sin inocular, así como la estrecha correlación entre la severidad de los síntomas de la FET y el PMG relativo. Estos resultados indicarían que las tendencias observadas en el Capítulo III para el conjunto de 112 aislamientos de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires se mantienen en el grupo reducido de 14 aislamientos. Puede concluirse entonces que la selección llevada a cabo representa fielmente al mayor grupo analizado en los ensayos de campo.

Los aislamientos difirieron en su capacidad de producción de micotoxinas tanto en los granos obtenidos de los ensayos de campo (*in vivo*) como en condiciones de cultivo en el laboratorio (*in vitro*). En condiciones de campo, los valores de DON superaron en todos los casos las 2 ppm., sobrepasando los límites tolerables para la comercialización de granos de acuerdo con los estándares de los países de la UE (van Egmond *et al.* 2007). El presente constituye el primer trabajo que analiza y relaciona tanto la capacidad de los aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina de inducir los síntomas de la FET en espigas de trigo pan infectadas a campo como su capacidad toxicogénica en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*.

La producción *in vitro* de DON por los aislamientos de *F. graminearum* fue muy elevada en todos los casos y no estuvo correlacionada con la producción *in vivo* de la toxina. Resultados similares fueron obtenidos por Walker *et al.* (2001) cuando estudiaron la producción de DON en condiciones de campo y de laboratorio. De acuerdo con este resultado, la capacidad de los aislamientos de producir toxinas en condiciones de laboratorio no tendría un correlato con su capacidad de producirlas en la espiga y en las condiciones naturales en las que los cultivos de trigo se llevan adelante.

Se ha propuesto que los tricotecnos DON y NIV jugarían un papel importante en la patogenicidad (Proctor *et al.* 1995). Sin embargo, la relación entre estos parámetros en los aislamientos de *F. graminearum* permanece sin ser aclarada. En nuestro trabajo, se encontró una estrecha correlación entre la severidad de los síntomas inducidos por los aislamientos en los ensayos de campo y la producción de DON *in vivo* y entre ésta y la disminución en el PMG respecto del testigo. El análisis de regresión confirmó una relación lineal positiva entre la severidad de la FET y la acumulación de DON en los

granos. Estos resultados permiten comprobar que la contaminación de los granos de trigo con micotoxinas es una consecuencia de la severidad de los síntomas de FET.

Los resultados presentados en nuestro trabajo se corresponden con los obtenidos por Mesterházy *et al.* (1999), quienes encontraron una relación cercana entre la agresividad de los aislamientos y su producción de DON en los granos. Mesterházy (2002), encontró una estrecha correlación entre la producción de DON y el desarrollo de la FET. En la Argentina, sin embargo, solo Álvarez *et al.* (2010) habían relacionado la producción de micotoxinas de los aislamientos de *F. graminearum* con la agresividad de los mismos. Los autores no encontraron que la capacidad de producir tricotecenos estuviera correlacionada con la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*.

En contraposición con la relación encontrada entre los indicadores de la severidad de la enfermedad y la producción de DON *in vivo*, ni la agresividad ni la caída en el PMG se vieron correlacionadas con la cantidad de micotoxina acumulada *in vitro*. Dentro de los mecanismos de resistencia de la planta de trigo a la FET, se ha propuesto que los tipos III (resistencia a la infección del grano) y IV (tolerancia a la infección) podrían estar relacionados con la capacidad del hospedante de degradar y/o tolerar la acumulación de DON (Langevin *et al.* 2004). La presencia de estos mecanismos de detoxificación en la planta y su interacción con la agresividad y la capacidad de producción de toxinas por los aislamientos de *F. graminearum* podrían ser los responsables de la ausencia de relación entre la capacidad de producir toxinas *in vitro* e *in vivo*.

Al estudiar la expansión de la infección del raquis por parte de *F. graminearum*, en todos los tratamientos analizados y para todas las pares espiguilla-artejo considerados el porcentaje de presencia del patógeno en el raquis superó ampliamente la inducción de síntomas visibles de FET a campo. Los tratamientos difirieron significativamente en el porcentaje de la espiga infectado por el hongo.

La tendencia de la distribución de los síntomas de la FET desde el PI hacia la base de las espigas inoculadas verificada en el análisis de los síntomas de la FET (ver Capítulo III) fue observada también para la expansión de la infección de los artejos del raquis. Estos resultados confirman que la ruta de progreso de la infección del patógeno en la espiga presenta una tendencia prevalentemente basípeta.

Del total de espigas evaluadas, en más del 90% se verificó la presencia del patógeno en los artejos correspondientes a las espiguillas inoculadas en los ensayos de campo. Este porcentaje resultó muy superior al 70% de incidencia observado cuando se analizó la presencia de síntomas visibles de la enfermedad a campo. De acuerdo con esto, en un alto número de espigas inoculadas la sola presencia de *F. graminearum* infectando el raquis no determinó que se produjeran los síntomas de la enfermedad. Más aún, excepto para la espiguilla apical, el porcentaje de colonización de los artejos ubicados por encima del PI resultó en todos los casos superior al porcentaje de espigas con síntomas de desecamiento prematuro en la misma porción. Esto indicaría que la sola presencia del patógeno en los tejidos vasculares de la espiga de trigo no resulta suficiente para el desarrollo de los síntomas de desecamiento prematuro de la porción apical de la misma. Este resultado avalaría la conclusión desprendida de los resultados de los ensayos de campo de que la capacidad de desecar prematuramente las espiguillas apicales es función de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* (ver Capítulo III), ya que con similares niveles de infección del raquis, solo los aislamientos más agresivos fueron capaces de inducir síntomas de desecamiento prematuro.

La infección de los artejos de las espigas inoculadas por *F. graminearum* se vio correlacionada con la severidad de los síntomas de la FET y, en menor medida, con el PMG relativo. En cuanto a la producción de micotoxinas, la infección estuvo muy relacionada con la cantidad de DON en los granos de trigo pero no con la producción de DON *in vitro*. Estos resultados contradicen los obtenidos por Gilbert *et al.* (2002), quienes no hallaron correlación entre la severidad de FET, la biomasa fúngica y la síntesis de DON.

La presencia del patógeno en el raquis de espigas asintomáticas podría explicar el hecho de que, incluso en bloques donde la expresión de síntomas de la FET resultó en valores de severidad de la enfermedad extremadamente bajos, los niveles de DON detectados en los granos cosechados resultaron considerables e incluso superiores a los tolerados en los estándares de comercialización. Estos resultados implicarían que aún aislamientos con limitada capacidad de inducción de síntomas visibles de FET y de disminución del PMG serían capaces de colonizar los tejidos vasculares de la espiga y de producir cantidades detectables de DON.

La búsqueda de genotipos de trigo resistentes o tolerantes a la FET que permitan disminuir el impacto de la contaminación con micotoxinas debe constituirse en un objetivo fundamental para los mejoradores vegetales. Sin embargo, los esfuerzos por correlacionar la tolerancia a DON con la resistencia a la enfermedad han tenido resultados inconsistentes (McCormick 2003). Los resultados obtenidos en el presente capítulo permiten suponer que limitando la exposición y disminuyendo la sensibilidad de la planta de trigo al DON se podrían poner límites al crecimiento y la virulencia de *F. graminearum* y, como consecuencia, contribuir a disminuir la severidad de la FET. En la búsqueda de cultivares de trigo resistentes, y adicionalmente a lo planteado en el Capítulo III, el testeo de la resistencia a la FET en programas de mejoramiento varietal debería incluir no solo grupos de aislamientos representativos de la agresividad presente en las poblaciones sino también de la capacidad de producción de DON de los mismos. El hecho de que incluso aislamientos capaces de inducir limitados síntomas de FET puedan constituir un importante riesgo de contaminación de los alimentos con micotoxinas resalta la necesidad de utilizar grupos de aislamientos de variado nivel de agresividad y capacidad toxicogénica en los ensayos de comportamiento varietal.

#### **4.5. CONCLUSIONES**

Los aislamientos de *F. graminearum* difieren en su capacidad de producción de micotoxinas *in vivo* e *in vitro*, y estas producciones no están correlacionadas.

Existe una estrecha correlación entre la severidad de los síntomas de la FET y la disminución en el PMG y la producción de DON *in vivo* pero no *in vitro*.

La tendencia de la distribución de los síntomas de la FET desde el PI hacia la base de las espigas inoculadas verificada en el Capítulo III fue observada también para la expansión de la infección de los artejos del raquis por parte de *F. graminearum*.

La sola presencia del patógeno en los tejidos vasculares de la espiga de trigo no resulta suficiente para el desarrollo de los síntomas de la FET o para provocar el desecamiento prematuro de la porción apical de la misma.

La infección del raquis se vio correlacionada con la severidad de los síntomas de la FET, con el PMG relativo y con la producción de DON *in vivo* pero no *in vitro*.

Aun aislamientos con limitada capacidad de inducción de síntomas de la FET serían capaces de colonizar los tejidos vasculares de la espiga y de producir cantidades detectables de DON.

Los resultados obtenidos permitieron confirmar las hipótesis de que las poblaciones de *F. graminearum* que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan niveles de capacidad toxicogénica similares y que la agresividad de estos aislamientos está directamente relacionada con la producción de deoxinivalenol de las mismas.





## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES GENERALES**



## CAPÍTULO V

### Conclusiones generales

#### 5.1. Contexto de la problemática abordada

En un contexto mundial de importante crecimiento poblacional y de aumento de la demanda de alimentos para los próximos años, el incremento del rendimiento medio de los cultivos resulta la estrategia más factible para alcanzar altos valores de producción. Las posibilidades de incrementar los rendimientos a futuro dependerán, en buena medida, de la capacidad de estrechar la brecha entre los rendimientos actuales y los potenciales. En este sentido, se vuelve indispensable el mejoramiento de las condiciones de producción y, para ello, la protección de los cultivos frente a factores adversos juega un papel fundamental.

El trigo representa más de un cuarto de la producción mundial de alimentos y abarca más de la mitad del comercio mundial de granos. Las estimaciones de pérdidas potenciales de rendimiento para el cultivo del trigo superan el 50% de la producción, con un 16% del volumen de pérdidas como resultado del ataque de patógenos fúngicos y bacterianos.

Uno de los principales patógenos fúngicos que ocasiona mermas en el rendimiento del cultivo del trigo y perjuicios sobre su calidad es *F. graminearum*, agente causal de la FET. A ello se suma la contaminación del grano con micotoxinas sintetizadas por el patógeno que constituyen un riesgo para la salud y comprometen su utilización en la alimentación.

La combinación de las características epidemiológicas del patógeno y la baja eficiencia del uso de prácticas culturales y del control químico para el mantenimiento de bajos niveles de ataque de la FET, hacen del uso de genotipos de trigo tolerantes o resistentes a la enfermedad la principal alternativa para su manejo. Para alcanzar el objetivo de obtener cultivares de trigo resistentes a la FET, el conocimiento de la agresividad de los aislamientos a ser utilizados y su variabilidad resulta de fundamental importancia en la evaluación de la resistencia de los genotipos.

Los estudios necesarios para diagramar una estrategia de mejoramiento varietal incluyen el análisis de la diversidad a nivel genético de las poblaciones de *F. graminearum* presentes en las áreas de cultivo del trigo, el estudio de la diversidad de la agresividad de los aislamientos y la relación existente entre ésta y la producción de toxinas. La necesidad de aportar información respecto de la diversidad genética y patogénica de *F. graminearum* de importancia para la toma de decisiones en la selección de estrategias de mejoramiento vegetal para el manejo de la FET justificó el desarrollo de la presente tesis doctoral.

#### 5.2. Variabilidad, agresividad y producción de micotoxinas en las poblaciones de *F. graminearum* de la Provincia de Buenos Aires

A través del análisis de secuencias específicas de ADN se ha descrito que al menos 13 especies filogenéticas conformarían el complejo de *F. graminearum*

(O'Donnell *et al.* 2004; Starkey *et al.* 2007; O'Donnell *et al.* 2008; Yli-Mattila *et al.* 2009). A pesar de que estas especies se encuentran ampliamente caracterizadas, la demostración de la posibilidad de cruzamiento de individuos pertenecientes a las distintas especies (Bowden *et al.* 2006) así como aspectos relacionados con la capacidad patogénica y toxicogénica de éstas han limitado su utilización.

En el Capítulo II del presente trabajo se detalla la obtención de 112 aislamientos de 28 localidades de la Provincia de Buenos Aires a partir de muestras de grano de trigo de tres campañas trigueras. La identificación taxonómica de los aislamientos obtenidos fue llevada adelante exclusivamente hasta el nivel de pertenencia al complejo de especies (*F. graminearum sensu lato* o en sentido amplio) de acuerdo con su morfo-fisiología y a un fragmento específico del genoma de 280 bp.

La variabilidad genotípica de estos aislamientos se evaluó mediante marcadores moleculares ISSR, que produjeron un 86% de fragmentos polimórficos que permitieron la identificación de haplotipos distintos para cada uno de los aislamientos, sugiriendo una alta heterogeneidad en las poblaciones de *F. graminearum* analizadas, en consonancia con los estudios previos de la diversidad genética en la Argentina. La naturaleza homotética de la reproducción sexual del patógeno, que le permite producir como resultado de la reproducción sexual ascocarpos tanto homocigotas como heterocigotas, resultaría una posible explicación de la alta variabilidad genética encontrada.

La presente tesis ha permitido demostrar que, aun con un número bajo de oligonucleótidos, los marcadores moleculares ISSR permiten diferenciar entre los distintos aislamientos de *F. graminearum* y resultan de utilidad para el estudio de la variabilidad genética presente en las poblaciones del patógeno.

Con estos ensayos se cumplieron los dos primeros objetivos planteados al momento de comenzar los trabajos de la tesis: “*obtener aislamientos de F. graminearum de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires*” y “*analizar la diversidad genética presente en las poblaciones de F. graminearum provenientes de distintas localidades de la Región Pampeana*”.

Dentro de los aislamientos analizados, algunos se organizaron al menos parcialmente en base al sitio de origen, posiblemente como reflejo de factores como las prácticas agronómicas y/o condiciones ecológicas prevalecientes en las áreas de procedencia de los aislamientos. Sin embargo, el AMOVA mostró que la mayor variabilidad genética en los patrones de bandas generados por marcadores moleculares ISSR resultó de diferencias entre aislamientos pertenecientes a la misma localidad, poniendo en duda la estructuración observada.

Debido a la naturaleza esporádica de los ataques de FET y a su dependencia de factores ambientales, la obtención de aislamientos del patógeno no resultó balanceada entre las distintas zonas de producción de trigo de la Provincia de Buenos Aires, entorpeciendo la determinación del real alcance de la estructuración geográfica en la variabilidad genética de los aislamientos de *F. graminearum* de la Argentina. Estos resultados permitieron aceptar solo parcialmente la hipótesis planteada de que “*las poblaciones de F. graminearum que provienen de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan similares niveles de diversidad a nivel genético*”.

En el Capítulo III, se estudió la variabilidad en la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*. Para ello se condujeron dos pruebas de patogenicidad en años sucesivos bajo condiciones de campo, utilizando la técnica de inoculación puntual. Estos ensayos permitieron analizar el comportamiento del patógeno en las condiciones de temperatura y humedad en las que el ataque de la enfermedad normalmente ocurre. El método de inoculación elegido se encuentra menos afectado por el ambiente y permitió en el presente trabajo el seguimiento de la dispersión de la FET en la espiga. Debido a que es un método trabajoso y lento de llevar adelante, es generalmente utilizado exclusivamente en ensayos bajo condiciones controladas. En este sentido, el presente trabajo constituye uno de los pocos estudios disponibles a nivel mundial de la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* evaluada mediante inoculación puntual en espigas de trigo cultivadas en condiciones de campo.

La técnica de inoculación seleccionada y la evaluación individual de las espigas inoculadas permitieron analizar dos aspectos de la capacidad de los aislamientos de inducir enfermedad: (i) la eficiencia de la infección y (ii) la severidad de la FET que refleja el tamaño de la lesión inducida. Estos dos aspectos del desarrollo de la FET no han sido abordados previamente al considerar la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*, los antecedentes bibliográficos generalmente han reportado solo las diferencias en la agresividad como la media de la severidad de los síntomas en las espigas. Su incorporación en el presente trabajo constituye un aspecto de originalidad en el tratamiento de la información relativa a la FET.

Todos los aislamientos de *F. graminearum* incluidos indujeron los síntomas típicos de la FET en las espigas inoculadas y las estimaciones de su agresividad resultaron un rasgo altamente heredable. La severidad de la enfermedad inducida por los aislamientos resultó variable y no estuvo estructurada geográficamente, sugiriendo que los resultados del análisis genotípico vistos en el Capítulo II no tendrían su correlato en aspectos fenotípicos relacionados con la agresividad de *F. graminearum*.

El atizonado y la deformación de las aristas asociados con el desecamiento prematuro de la espiga fueron observados en numerosos tratamientos en ambos años de ensayos. La ocurrencia de estos síntomas resultó ser una función de la agresividad de los aislamientos.

En los ensayos de campo se observó que los síntomas se dispersaron principalmente hacia la base de las espigas, por debajo del PI. Coincidentemente, cuando las espigas de 14 tratamientos seleccionados fueron trilladas a mano y los artejos sembrados en medio de cultivo para analizar su infección por *F. graminearum*, esta tendencia fue confirmada por la expansión de la misma.

La infección por parte de *F. graminearum* de los artejos de las espigas se vio correlacionada con la severidad de los síntomas de la FET; sin embargo, la presencia del patógeno en los tejidos vasculares de la espiga no resultó condición suficiente para el desarrollo de los mismos o para la inducción del desecamiento prematuro de la porción apical.

Con un número importante de aislamientos provenientes de un amplio rango de localidades de la principal provincia triguera argentina, el presente trabajo representa un importante adelanto en el conocimiento de la variación de la agresividad presente en las poblaciones de *F. graminearum* de la Argentina. Los análisis conducidos permitieron cumplir con el objetivo planteado de “determinar la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum*” y aceptar la hipótesis de que “las poblaciones de *F. graminearum* que

*proviene de distintas localidades de la Provincia de Buenos Aires presentan similares niveles de agresividad”.*

La capacidad de producción de micotoxinas de los aislamientos obtenidos se analizó en el Capítulo IV. En consecuencia, el presente constituye el primer trabajo que analiza y relaciona tanto la capacidad de los aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina de inducir síntomas en espigas de trigo pan infectadas a campo como su capacidad de producir toxinas en condiciones tanto *in vivo* como *in vitro*.

El quimiotipo de los aislamientos fue determinado como DON sobre la base de la amplificación de fragmentos específicos de los genes *Tri5* y *Tri7*, relacionados con la producción de tricotecenos, mediante PCR. Una mayor fitotoxicidad del DON sobre el NIV hacia el trigo podría ser la causa de la prevalencia del quimiotipo *I* hallada en los aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina.

Para el análisis de la producción de DON mediante ELISA, se redujo el número de aislamientos a 14, seleccionados debido a que representaron fielmente al mayor grupo analizado en los ensayos de campo. Estos aislamientos difirieron en su capacidad de producción de micotoxinas tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo las producciones de micotoxinas en ambos sustratos no estuvieron correlacionadas.

Con estos resultados se cumplió con el objetivo de “*cuantificar la capacidad de producción de tricotecenos de los aislamientos*”. Seguidamente, se buscó cumplir con el objetivo planteado de “*correlacionar la acumulación de tricotecenos con la agresividad y la capacidad de colonización de la espiga de las cepas de F. graminearum*”.

Una estrecha correlación fue encontrada entre la severidad de los síntomas inducidos por los aislamientos en los ensayos de campo y la producción de DON *in vivo* y entre ésta y la disminución en el PMG. En contraposición, ni la agresividad ni la caída en el PMG se vieron correlacionadas con la cantidad de micotoxina acumulada *in vitro*.

Correlaciones significativas se encontraron entre la infección del raquis y la producción de DON *in vivo*. Los resultados obtenidos indicarían que aún aislamientos con limitada capacidad de inducción de síntomas visibles de FET serían capaces de colonizar los tejidos vasculares de la espiga y de producir cantidades detectables de DON.

Estos resultados permitieron aceptar solo parcialmente la hipótesis planteada de que “*la agresividad de los aislamientos de F. graminearum de la Provincia de Buenos Aires está directamente relacionada con la producción de deoxinivalenol de las mismas*”.

### 5.3. Aplicaciones de los resultados obtenidos

Como fuera descrito en el Capítulo I, debido a la naturaleza de la infección por *F. graminearum* y a la baja eficiencia del uso de otras prácticas para el mantenimiento de bajos niveles de ataque de la FET, la principal alternativa para el manejo de la enfermedad la constituye el uso de genotipos de trigo resistentes o tolerantes al ataque del patógeno, que a su vez permitan disminuir el impacto de la contaminación con micotoxinas en los alimentos. Para alcanzar el propósito de obtener dichos materiales, el conocimiento de la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* a utilizar así como de su capacidad toxicogénica resulta uno de los aspectos más importantes.

A través del seguimiento del desarrollo de la FET en espigas de trigo inoculadas mediante inoculación puntual a campo, en el desarrollo del presente trabajo se encontraron altos niveles de variabilidad en la agresividad de los aislamientos de *F. graminearum* de la región triguera argentina, la cual se ha propuesto está definida por el efecto integrado de la eficiencia de la infección y el tamaño de la lesión. Estos altos niveles de variabilidad en la agresividad y el hecho de que esta no se encuentre estructurada geográficamente subrayan la necesidad de elegir correctamente los aislamientos a utilizar en pruebas de patogenicidad y de incluir un gran número de aislamientos en la búsqueda de resistencia por parte de los programas de mejoramiento.

Adicionalmente, los análisis de la capacidad toxicogénica de los aislamientos de *F. graminearum* ensayados sugieren que limitando la exposición y disminuyendo la sensibilidad de la planta de trigo al DON se podrían poner límites al crecimiento y la virulencia de *F. graminearum* y con ello contribuir a disminuir la severidad de la FET. Consecuentemente, los aislamientos a utilizar en las pruebas de patogenicidad deberían ser representativos no solo de los grupos de agresividad presentes en las poblaciones sino también de su toxicogenia, debido a que incluso aislamientos capaces de inducir limitados síntomas de FET puede constituir un importante riesgo de contaminación de los alimentos con micotoxinas.

Otro de los aspectos a tener en cuenta al momento de seleccionar los genotipos es la estimación precisa del alcance de los síntomas de la FET, fundamentalmente cuando se considera su utilización como estimador de la resistencia genética a la enfermedad. De acuerdo con nuestros resultados, se debería tener especial cuidado cuando se evalúan la agresividad de aislamientos de *F. graminearum* y la respuesta de cultivares de trigo a la FET utilizando estimaciones visuales de la severidad de la enfermedad, debido al frecuente desarrollo de síntomas de desecamiento prematuro. Estos síntomas resultarían en la sobrestimación del impacto de la infección cuando el desecamiento es confundido con los síntomas producidos por la infección del patógeno. Como se discutió en el Capítulo III, los resultados obtenidos sugerirían que el desecamiento prematuro de las espigas es una función de la agresividad de los aislamientos, razón por la cual se deben tomar grandes recaudos en las estimaciones de la enfermedad inducida en los genotipos de trigo. En este sentido, la cercana relación encontrada entre la disminución del PMG, el ABCPE y la estimación visual de la severidad sugiere que éstos pueden resultar indicadores útiles de la resistencia a la FET.

#### **5.4. Nuevos interrogantes surgidos a partir del presente estudio**

Los estudios desarrollados para la confección de la presente tesis han permitido resolver algunos de los aspectos más importantes relacionados con el desarrollo de programas de mejoramiento varietal, que resultan de vital importancia en un contexto mundial de creciente preocupación por la inocuidad de los alimentos. Sin embargo, estos resultados han abierto también una serie de interrogantes cuya resolución merece de atención.

Como se ha ya mencionado, sería de gran importancia el desarrollo de proyectos a largo plazo, abarcando la amplia región de cultivo de trigo de la Argentina en un importante número de campañas trigueras, que permitieran reafirmar los resultados parciales obtenidos en el presente trabajo, en particular respecto de la organización de los genotipos del patógeno de acuerdo a su procedencia geográfica. La obtención de aislamientos de zonas con características climáticas contrastantes en forma balanceada

permitiría el estudio exhaustivo de las características de organización de los genotipos de *F. graminearum*.

Los resultados obtenidos en el análisis de la agresividad de las poblaciones de *F. graminearum*, por su parte, resultarán de apoyo para los fitomejoradores en la selección de los aislamientos a utilizar en el desarrollo de programas de mejoramiento varietal tendientes a obtener materiales tolerantes o resistentes a la FET. Sin embargo, el conocimiento respecto del comportamiento de los genotipos de trigo actualmente bajo cultivo en la Argentina es escaso y asociado a información obtenida como consecuencia de infecciones naturales. En este sentido, es de vital importancia el desarrollo de programas conjuntos entre investigadores, universidades y mejoradores que persigan el objetivo de caracterizar la presencia de fuentes de resistencia y su durabilidad tanto en los cultivares modernos como en sus antecesores. La información así obtenida resultaría de fundamental relevancia para el desarrollo de programas de mejoramiento tendientes a obtener resistencia genética a la FET.

Finalmente, la ausencia de correlación entre la producción de micotoxinas *in vitro* por los aislamientos de *F. graminearum* y su agresividad y entre la producción *in vivo* e *in vitro* permiten suponer la existencia de mecanismos de detoxificación en la planta de trigo. Por otro lado, los resultados obtenidos indicarían también la posibilidad de que algunos aislamientos sean capaces de colonizar los tejidos vasculares de la espiga y de producir cantidades detectables de DON aun cuando la inducción de síntomas visibles de FET por parte de los mismos resulte limitada. Estos resultados indicarían la complejidad de la interacción entre la planta de trigo y *F. graminearum*, y remarcan la necesidad de estudiar en profundidad los mecanismos puestos en juego en esta interacción, dada su importancia potencial para el desarrollo de cultivares capaces de minimizar la acumulación de DON en los granos.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abramson, D., Clear, R.M. y Smith, D.M. 1993. Trichothecene production by *Fusarium* spp. isolated from Manitoba grain. Canadian Journal of Plant Pathology, 15: 147-152.
- Adams, G.C. y Hart, L.P. 1989. The role of deoxinivalenol and 15-acetyldeoxynivalenol in pathogenesis of *Gibberella zeae*, as elucidated through protoplasts fusions between toxigenic and nontoxigenic strains. Phytopathology, 79: 404-408.
- Álvarez, C.L., Azcárate, M.P., Cabral, D. y Fernández Pinto, V. 2007. Profiles of mycotoxin production by *Fusarium graminearum* lineage 7 isolates. En: ICC International Conference on Cereals and Cereal Products Quality and Safety. 23-26 de Septiembre, Rosario, Argentina.
- Álvarez, C.L., Soma, S., Moretti, A. y Fernández Pinto, V. 2010. Aggressiveness of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates in wheat kernels in Argentina. Journal of Phytopathology, 158: 173-181.
- Andersen, A.L. 1948. The development of *Gibberella zeae* headblight of wheat. Phytopathology, 38: 595-611.
- Andrison, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence: the need for precision. Phytopathology, 83: 889-890.
- Andrison, D. 1995. Nomenclature for pathogenicity and virulence: precision vs. tradition. Phytopathology, 85: 518-519.
- Aoki, T. y O'Donnell, K. 1999. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the group 1 population of *F. graminearum*. Mycologia, 91: 597-609.
- Argyris, J., TeKrony, D., Hershman, D., VanSanford, D., Hall, M., Kennedy, B., Rucker, M. y Edge, C. 2005. Fusarium head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. Crop Science, 45: 626-634.
- Arseniuk, E., Foremska, E., Goral, T. y Chelkowski, J. 1999. Fusarium head blight reactions and accumulation of deoxynivalenol (DON) and some of its derivatives in kernels of wheat, triticale and rye. Journal of Phytopathology, 147: 577-590.
- Bai, G-H. y Shaner, G. 1994. Scab of wheat: prospects for control. Plant Disease, 78: 760-766.
- Bai, G-H. y Shaner, G. 1996. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. Plant Disease, 80: 975-979.
- Bai, G-H., Plattner, R., Desjardins, A., Kolb, F. y Jones, S.S. 2001. Resistance to fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in wheat. Plant Breeding, 120: 1-6.
- Bakan, B., Giraud-Delville, C., Pinson, L., Richard-Molard, D., Fournier, E. y Brygoo y. 2002. Identification by PCR of *Fusarium culmorum* strains producing large and small amounts of deoxynivalenol. Applied and Environmental Microbiology, 68: 5472-5479.
- Bayraktar, H. y Dolar, F.S. 2011. Molecular identification and genetic diversity of *Fusarium* species associated with onion fields in Turkey. Journal of Phytopathology, 159: 28-34.

- Bennett, J.W. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497–516.
- Blaney, B.J. y Dodman, R.L. 1988. Production of the mycotoxins zearalenone, deoxynivalenol and nivalenol by isolates of *Fusarium graminearum* Groups 1 and 2 from cereals in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, 39: 21-29.
- Blount, W.P. 1961. Turkey “X” Disease. *Turkeys*, 9: 52-77.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bos, L. y Parlevliet, J.E. 1995. Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 69–102.
- Bowden R.L., Leslie J.F., Lee J. y Lee Y-W. 2006. Cross fertility of lineages in *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*). Pp. 54–60 en Ban, T., Lewis, J.M. y Phipps, E.E. (eds), *The Global Fusarium Initiative for International Collaboration: a strategic planning workshop*. CIMMYT, El Batán, Mexico.
- Bowden, R.L. y Leslie, J.F. 1992. Nitrate-nonutilizing mutants of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) and their use in determining vegetative compatibility. *Experimental Mycology*, 16: 308-315.
- Bowden, R.L. y Leslie, J.F. 1997. Diversity and sexuality in *Gibberella zeae*. Pp. 35–39 en Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds.) *Fusarium Head Scab: global status and future prospects*. Proceedings of a Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico. CIMMYT, Mexico D.F., Mexico.
- Bowden, R.L., y Leslie, J.F. 1999. Sexual Recombination in *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 89: 182–188.
- Buell, C.B. y W.H. Weston. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *American Journal of Botany*, 34: 555-561.
- Bushnell, W.R., Hazen, B.E. y Pritsch, C. 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. Pp. 44-83 en Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Cappellini, R.A. y Peterson, J.L. 1965. Macroconidium formation in submerged cultures by a non-sporulating strain of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 57:962–966.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Desjardins, A.E. y Nicholson, P. 2000. Variation in *Fusarium graminearum* isolates from Nepal associated with their host of origin. *Plant Pathology*, 49: 452-460.
- Carter, J.P., Rezanoor, H.N., Holden, D., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. y Nicholson, P. 2002. Variation in pathogenicity associated with the genetic diversity of *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 573-583.
- CAST. 1989. Mycotoxins: economic and health risks, task force report 116. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. y Helling, R.B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 3240-3244.

- Copia, P.A. 2012. Tesis Doctoral: Fusariosis de la Espiga de Trigo: Quimiotaxonomía de las especies de *Fusarium* asociadas y caracterización de germoplasma con resistencia a la enfermedad y a la producción de micotoxinas. Universidad Nacional de Río Cuarto
- Correll, J.C., Klittich, C.J.R. y Leslie, J.E. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, 77: 1640-1646.
- Crisci, J.V. y López Armengol, M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C, USA.
- Cumagun, C.J.R. y Miedaner, T. 2003. Aggressiveness of 42 isolates of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) in wheat under field and greenhouse conditions. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz - Journal of Plant Diseases and Protection*, 110: 554–559.
- Cumagun, C.J.R. y Miedaner, T. 2004. Segregation for aggressiveness and deoxynivalenol production of a population of *Gibberella zeae* causing head blight of wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 789-799.
- Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F. y Miedaner, T. 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology*, 94: 520-526.
- Cuniberti, M., Mir, L., Berra, O. y Macagno, S. 2013. Calidad del trigo de la región central del país. Campaña 2012/13. Boletín del INTA disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/calidad-del-trigo-de-la-region-central-del-pais-campana-2012-13-4/>.
- Dalcero, A., Torres, A., Etcheverry, M., Chulze, S. y Varsavsky, E. 1997. Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat. *Food Additives and Contaminants*, 14: 11–14.
- de Galich, M.T.V. 1997. Fusarium head blight in Argentina. Pp. 19–26 en Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds.) *Fusarium Head Scab: global status and future prospects*. Proceedings of a Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico. CIMMYT, Mexico D.F., Mexico.
- Desjardins, A. 1992. Genetic approaches to the chemical ecology of phytopathogenic *Fusarium* species. Pp. 333–357 en Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B. y Arora, D. K. (eds.) *Handbook of Applied Mycology. Volume 5: Mycotoxins in Ecological Systems*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Desjardins, A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins. Chemistry, genetics, and biology. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Desjardins, A.E. y Proctor, R.H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International journal of food microbiology*, 119: 47–50.
- Desjardins, A.E., Hohn, T.M. y McCormick, S.P. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiological Reviews*, 57: 595-604.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G-H., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. y Hohn, T.H. 1996. Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants

- of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9: 775-781.
- Dill-Macky, R. 2003. Inoculation methods and evaluation of *Fusarium* head blight resistance in wheat. Pp. 184-210 en: Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium head blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Dill-Macky, R. y Jones, R.K. 2000. Effects of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat. *Plant Disease*, 84: 71-76.
- Dinolfo, M.I., Stenglein, S.A., Moreno, M.V., Nicholson, P., Jennings, P. y Salerno, G.L. 2010. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 483-491.
- Dubey, S.C. y Singh, S.R. 2008. Virulence analysis and oligonucleotide fingerprinting to detect diversity among indian isolates of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* causing chickpea wilt. *Mycopathologia*, 165: 389-406.
- Dubin, H.J., Gilchrist, L., Reeves, J. y McNab, A. (eds.) 1997. *Fusarium Head Scab: global status and future prospects*. Proceedings of a Workshop held at CIMMYT, El Batán, Mexico. CIMMYT, Mexico D.F., Mexico.
- Dusabenyagasani, M., Dostale, D. y Hamelin, R.C. 1999. Genetic diversity among *Fusarium graminearum* strains from Ontario and Quebec. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21: 308-314.
- Evans, L.T. y Fischer, R.A. 1999. Yield potential: its definition, measurement and significance. *Crop Science*, 39:1544-1551.
- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Faifer, G.C., Sala De Miguel, M. y Godoy, H.M. 1990. Patterns of mycotoxin production by *Fusarium graminearum* isolated from Argentine wheat. *Mycopathologia*, 109: 165-170.
- Fehr, W.R. 1987. *Principles of cultivar development. Theory and technique*. Vol. 1. Macmillan Publishing, New York, USA.
- Fernández Pinto, V., Terminiello, L.A., Basilico, J.C. y Ritieni, A. 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 157-162.
- Forsyth, O.M., Yoshizawa, T., Morooka, N. y Tuite, J. 1977. Emetic and refusal activity of the deoxynivalenol to swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 547-552.
- Francis, R.G. y Burgess, L.W. 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* "Graminearum" in Eastern Australia. *Transactions of the British Mycological Society*, 68: 421-427.

- Gale, L.R., Bryant, J.D., Calvo, S., Giese, H., Katan, T., O'Donnell, K., Suga, H., Taga, M., Usgaard, T.R., Ward, T.J. y Kistler, H.C. 2005. Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. *Genetics*, 171: 985–1001.
- Gale, L.R. 2003. Population biology of *Fusarium* species causing head blight of grain crops. Pp. 120-143 en Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium head blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Gale, L.R., Chen, L.-F., Hernick, C.A., Takamura, K. y Kistler, H.C. 2002. Population analysis of *Fusarium graminearum* from wheat fields in Eastern China. *Phytopathology*, 92: 1315-1322.
- Gams, W., Humber, R.A., Jaklitsch, W., Kirschner, R. y Stadler, M. 2012. Minimizing the chaos following the loss of Article 59: Suggestions for a discussion. *Mycotaxon* 119: 495–507.
- Gams, W. y Jaklitsch, W. 2011. Fungal nomenclature 3. A critical response to the “Amsterdam Declaration”. *Mycotaxon* 116: 501–512.
- Gerlach, W. y Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land und Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem)*, 209: 1-405.
- Gilbert, J. y Tekauz, A. 2000. Review: Recent developments in research on *Fusarium* head blight of wheat in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 1–8.
- Gilbert, J., Abramson, D., McCallum, B. y Clear, R. 2002. Comparison of Canadian *Fusarium graminearum* isolates for aggressiveness, vegetative compatibility, and production of ergosterol and mycotoxins. *Mycopathologia*, 153: 209-215.
- Giménez, O. 1969. Historia del cultivo de trigo en el país. Pp. 156-214 en Simposio del trigo en homenaje al Ing. Agr. y Dr. *Honoris Causa* Enrique Klein. Buenos Aires, 5 al 8 de mayo de 1969. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Buenos Aires, Argentina.
- González, H.H.L., Moltó, G.A., Pacin, A., Resnik, S.L., Zelaya, M.J., Masana, M. y Martínez, E. J. 2008. Trichothecenes and mycoflora in wheat harvested in nine locations in Buenos Aires province, Argentina. *Mycopathologia*, 165: 105-114.
- Gordon, W.L. 1959. The occurrence of *Fusarium* species in Canada: VI. Taxonomy and geographic distribution of *Fusarium* species on plants, insects, and fungi. *Canadian Journal of Botany*, 37: 257-290.
- Gosman, N., Bayles, R., Jennings, P., Kirby, J. y Nicholson, P. 2007. Evaluation and characterization of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum* in UK winter wheat cultivars. *Plant Pathology*, 56: 264–276.
- Gosman, N., Chandler, E., Thomsett, M., Draeger, R. y Nicholson, P. 2005. Analysis of the relationship between parameters of resistance to *Fusarium* head blight and in vitro tolerance to deoxynivalenol of the winter wheat cultivar WEK0609®. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 57–66.
- Goswami, R.S. y Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515–525.

- Goswami, R.S. y Kistler, H.C. 2005. Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and rice. *Phytopathology*, 95: 1397-1404.
- Harlan, J.R. 1992. Crops and man. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Harris, J.L., Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nicholson, P., Butler, G., Young, J.C., Weston, G., Proctor, R.H. y Hohm, T.M. 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease*, 83: 954-960.
- Hawksworth, D.L. 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA fungus* 2: 155–162.
- Hunt, R.S. 1994. Comment on the letter by Andrivon—Re: pathogenicity and virulence. *Phytopathology*, 84: 874–875.
- Ichinoe, M., Kurata, H., Sugiura, Y. y Ueno, Y. 1983. Chemotaxonomy of *Gibberella zeae* with special reference to production of trichothecenes and zearalenone. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 1364-1369.
- IFPRI. 2012. 2011 Global Food Policy Report. International Food Policy Research Institute, Washington, DC, USA. Disponible en: [www.ifpri.org/gfpr/2011](http://www.ifpri.org/gfpr/2011) (accedido el 12 de octubre de 2012).
- Jones, N., Ougham, H. y Thomas, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist*, 137: 165-177.
- Jones, N., Ougham, H., Thomas, H. y Pasakinskiene, I. 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytologist*, 183: 935-66.
- Kendrick, B. 1992. The fifth kingdom. Focus Texts, Newburyport, USA.
- Kikot, G.E., Moschini, R.C., Consolo, V.F., Rojo, R., Salerno, G., Hours, R.A., Gasoni, L., Arambarri, A.M. y Alconada, T.M. 2011. Occurrence of different species of *Fusarium* from wheat in relation to disease levels predicted by a weather-based model in Argentina pampas region. *Mycopathologia*, 171: 139-149.
- Kohli, M.M., Annone, J.G. y de Galich, M.T.V. 1995. Fusariosis de la espiga y su manejo. Pp: 164-189 en Kohli, M.M., Annone, J.G., y Garcia, R. (eds.) Las enfermedades del trigo en el Cono Sur. Curso de manejo de enfermedades de trigo. Centro Internacional de Capacitación INTA-CIMMYT, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- Langevin, F., Eudes, F. y Comeau, A. 2004. Effect of trichothecenes produced by *Fusarium graminearum* during fusarium head blight development in six cereal species. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 735–746.
- Langseth, W. y Rundberget, T. 1998. Instrumental methods for determination of nonmacrocylic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. *Journal of Chromatography A*, 815: 103–121.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. y Gelfand, D.H. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 6427–6437.



- Lee, T., Han, Y., Kim, K. y Yun, S. 2002. *Tri13* and *Tri7* determine deoxynivalenol- and nivalenol-producing chemotypes of *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2148–2154.
- Leslie, J.F. y Summerell, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing. Ames, USA.
- Liu, W.Z., Langseth, W., Skinnies, H., Elen, O.N. y Sundheim, L. 1997. Comparison of visual head blight ratings, seed infection levels, and deoxynivalenol production for assessment of resistance in cereals inoculated with *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 589–595.
- Logrieco, A., Bottalico, A. y Altomare, C. 1988. Chemotaxonomic observations on zearalenone and trichothecene production by *Gibberella zeae* from cereals in southern Italy. *Mycologia*, 80: 892–895.
- Lori, G.A. y I. Rizzo. 2007. Deoxynivalenol. Pp. 396–421 en Soriano del Castillo, J.M. (ed.) *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos, Valencia, España.
- Lori, G.A., Carranza, M.R., Violante, A., Rizzo, I. y Alippi, H.E. 1992: *Fusarium spp.*, en trigo, capacidad toxicogénica y quimiotaxonomía de las cepas aisladas en la Argentina. *Agronomie*, 12: 459–467.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Haidukowski, M. y Rizzo, I. 2003. *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiological Research*, 158: 29–35.
- Lori, G.A., Sisterna, M.N., Sarandón, S.J, Rizzo, I. y Chidichimo, H. 2009. *Fusarium* head blight in wheat: impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. *Crop Protection*, 28: 495–502.
- Lurá, M.C., Latorre Rapela, M.G., Vaccari, M.C., Maumary, R., Soldano, A., Mattio, M. y González, A.M. 2011. Genetic diversity of *Cercospora kikuchii* isolates from soybean cultured in Argentina as revealed by molecular markers and cercosporin production. *Mycopathologia*, 171: 361–371.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. y Tousson, T.A. 1984. *Toxigenic Fusarium species: identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- McCormick, S.P. 2003. The role of DON in pathogenicity. Pp. 165–183 en Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- McIntosh, M.S. 1983. Analysis of combined experiments. *Agronomy Journal*, 75: 153–155.
- McMullen, M., Jones, R. y Gallemberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*, 81: 1340–1348.
- Mesterházy, A. 1981. The role of aggressiveness of *Fusarium graminearum* isolates in the inoculation tests on wheat in seedling state. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 16: 281–292.
- Mesterházy, A. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 675–684.

- Mesterházy, Á. 2003. Breeding wheat for *Fusarium* head blight resistance in Europe. Pp. 211-240 en: Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium Head Blight of wheat and barley*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Mesterházy, Á., Bartók, T., Mirocha, C.G. y Komoróczy, R. 1999. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding*, 118: 97-110.
- Miedaner, T. y Schilling, A.G. 1996. Genetic variation of aggressiveness in individual field populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* tested on young plants of winter rye. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 823-830.
- Miedaner, T., Cumagun, C.J.R. y Chakraborty, S. 2008. Population genetics of three important head blight pathogens *Fusarium graminearum*, *F. pseudograminearum* and *F. culmorum*. *Journal of Phytopathology*, 156: 129-139.
- Miedaner, T., Gang, G. y Geiger, H.H. 1996. Quantitative-genetic basis of aggressiveness of 42 isolates of *Fusarium culmorum* for winter rye head blight. *Plant Disease*, 80: 500-504.
- Miedaner, T., Moldovan, M. e Ittu, M. 2003. Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to fusarium head blight in a multienvironment wheat trial. *Phytopathology*, 93: 1068-1072.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C. y Schilling, A.G. 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium graminearum* in winter rye head blight. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107: 124-134.
- Miedaner, T., Schilling, A.G. y Geiger, H.H. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *Phytopathologische Zeitschrift - Journal of Phytopathology*, 149: 641-648.
- Milisich, H., Gieco, L., Ocampo, O. y Gallardo, M. 2012. Evaluación de cultivares de trigo recomendados para la subregión III. Año 2011. Pp. 21-29 en: Jornada Regional de Cultivos de Invierno - Campaña 2012. Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNER. Oro Verde, Entre Ríos.
- Miller, J.D., ApSimon, J.W., Blackwell, B.A., Greenhalgh, R. y Taylor, A. 2001. Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. Pp. 310-320 en Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L. y Burgess, L.W. (eds.) *Fusarium* Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Miller, J.D., Culley, J., Fraser, K., Hubbard, S., Meloche, F., Ouellet, T., Seaman, L., Seifert, K., Turkington, K. y Voldeng, H., 1998. Effect of tillage on fusarium head blight of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 20: 95-103.
- Miller, J.D., Taylor, A. y Greenhalgh, R. 1983. Production of deoxynivalenol and related compounds in liquid culture by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1171-1178.

- Mirocha, C.J., Xie, W. y Filho, E.R. 2003. Chemistry and detection of *Fusarium* mycotoxins. Pp. 144-183 en Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium* head blight of wheat and barley. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Mishra, P.K., Fox, R.T.V. y Culham, A. 2003. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Annals of Applied Biology*, 143: 291-301.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M. y Turkington, T.K. 2004. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Annals of Applied Biology*, 145: 299-307.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M. y Turkington, T.K. 2006. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *International Microbiology*, 9: 65-68.
- Moreno, M.V., Stenglein, S.A., Balatti, P.A. y Perelló, A.E. 2008. Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 122: 239-252.
- Morooka, N., Uratsuji, N., Yoshizawa, T. y Yamamoto, H. 1972. Studies on the toxic substances in barley infected with *Fusarium* spp. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 13: 368-375.
- Moschini, R. y Fortugno, C. 1996. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 211-218.
- Moschini, R.C., de Galich, M.T.V., Annone, J.G. y Polidoro, O. 2002. Enfoque fundamental-empírico para estimar la evolución del índice de *Fusarium* en trigo. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 31: 39-53.
- Moschini, R.C., Pioli, R., Carmona, M. y Sacchi, O. 2001. Empirical predictions of wheat head blight in the northern Argentinean Pampas region. *Crop Science*, 41: 1541-1545.
- Mourellos, C.A., Malbrán, I., Balatti, P.A., Ghiringhelli, P.D. y Lori, G.A. 2011. Fusariosis de la espiga de trigo: monitoreo de malezas como fuente de inóculo y detección de *Fusarium graminearum*. Pp. 218 en Libro de Resúmenes del 2do Congreso Argentino de Fitopatología. 1 al 3 de junio de 2011, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina
- Moss, M.O. 1996. Mycotoxins. Centenary Review. *Mycological Research*, 100: 513-523.
- Moss, M.O. y Thrane, U. 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicology Letters*, 153: 23-28.
- Mullis, K. y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, 55: 335-350.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.

- Nesbitt, M. 2001. Wheat evolution: integrating archaeological and biological evidence. Pp. 37–59 en Caligari, P.D.S. y Brandham, P.E. (eds.) Wheat taxonomy: the legacy of John Percival, vol.3, Linnean, Special Issue. Linnean Society, London.
- Nelson, P.E. 1991. History of *Fusarium* systematics. *Phytopathology*, 81: 1045-1048.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press. University Park, Pennsylvania, USA.
- Nicholson, P., Simpson, D.R., Weston, G., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. y Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 17-37.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Tacke, B.K. y Casper, H.H. 2000. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 7905-7910.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Aberra, D., Kistler, H.C., Aoki, T., Orwig, N., Kimura, M., Bjørnstad, Å. y Klemsdal, S.S. 2008. Multilocus genotyping and molecular phylogenetics resolve a novel head blight pathogen within the *Fusarium graminearum* species complex from Ethiopia. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1514-1522.
- O'Donnell, K., Ward, T.J., Geiser, D.M., Kistler, H.C. y Aoki, T. 2004. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600–623.
- Oerke, E.C. y Dehne, H.W. 2004. Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23:275-285.
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. y Lannou, C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58: 409-424.
- Parry, D.W., Jenkinson, P. y McLeod, L. 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology*, 44: 207-238.
- Pioli, R.N., Mozzoni, L. y Morandi, E.N. 2004. First report about pathogenic association between *Fusarium graminearum* and Soybean. *Plant Disease*, 88: 220.
- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R. y Sims, A.L. 2004a. Survival and inoculum production of *Gibberella zeae* in wheat residue. *Plant Disease*, 88: 724–730.
- Pereyra, S.A., Dill-Macky, R. y Garcia, M., 2004b. Survival of *Gibberella zeae* and inoculum contribution of diverse plant species in prevalent crop rotations in Uruguay. Pp. 489–492 en: Canty, S.M., Boring, T., Wardwell, J., Ward, R.W. (eds.). *Proceedings of the 2nd International Symposium on Fusarium Head Blight, Incorporating to the 8th European Fusarium Seminar*, Orlando, FL, USA.

- Proctor, R.H., Hohn, M.T. y McCormick, S.P. 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 593-601.
- Proctor, R.H., Hohn, M.T. y McCormick, S.P. 1997. Restoration of wild type virulence of *Tri5* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. *Microbiology*, 143: 2583-2591.
- Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, 63: 179-183.
- Purss, G.S. 1971. Pathogenic specialization in *Fusarium graminearum*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 22: 553-561.
- Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Logrieco, A., Mulè, G. y Visconti, A. 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. *FEMS microbiology letters*, 259:7-13.
- Quarta, A., Mita, G., Haidukowski, M., Santino, A., Mulè, G. y Visconti, A. 2005. Assessment of trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* occurring in Europe. *Food additives and contaminants*, 22:309-315.
- Rajaram, S. 2001. Prospects and promise of wheat breeding in the 21st century. *Euphytica*, 119: 3-15.
- Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C. y Chulze, S. 2006. Vegetative compatibility and mycotoxin chemotypes among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 139-148.
- Ramírez, M.L., Reynoso, M.M., Farnochi, M.C., Torres, A.M., Leslie, J.F. y Chulze, S.N. 2007. Population structure of *Gibberella zeae* isolated from wheat in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, 24: 1115-1120.
- Reece, R.J. 2004. *Analysis of genes and genomes*. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, Inglaterra.
- Reis, E.M., Fernandes, J.M.C. y Picinini, E.C. 1988. Estrategias para o controle de doenças do trigo. EMBRAPA-CNPT, Passo Fundo, 50 pp.
- Reis, E.M., 1990. Integrated disease management – the changing concepts of controlling headblight and spot blotch. Pp. 165–177 en Saunders, D.A. (ed.). *Wheat for the Nontraditional Warm Areas*. Proceeding of the International Conference. CIMMYT, México D.F., México.
- Reynoso, M.M., Ramírez, M.L., Torres, A.M. y Chulze, S.N. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 444-448.
- Ribichich, K.F., Lopez, S.E. y Vegetti, A.C. 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease*, 84: 794-802.
- Rizzo, I., Lori, G., Vedoya, G., Carranza, M., Haidukowski, M., Varsavsky, E., Frade, H., Chiale, C. y Alippi, H. 1997. Sanitary factors and mycotoxin

- contamination in the argentinian wheat crop 1993/94. *Mycotoxin Research*, 13: 67-72.
- Saiki, R., Scharf, S., Fallona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. y Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sampietro, D.A., Díaz, C.G., Gonzalez, V., Vattuone, M.A., Ploper, L.D., Catalan, C.A.N. y Ward, T.J. 2011. Species diversity and toxigenic potential of *Fusarium graminearum* complex isolates from maize fields in northwest Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 359-364.
- Sampietro, D.A., Marín, P., Iglesias, J., Presello, D.A., Vattuone, M.A., Catalan, C.A.N. y Gonzalez Jaen, M.T. 2010. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal biology*, 114: 74-81.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. y Carnaghan, R.B.A. 1961. Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature*, 192: 1096-1097.
- Savard, M.E., Sinha, R.C., Seaman, W.L. y Fedak, G. 2000. Sequential distribution of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat spikes after inoculation with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22: 280-285.
- Schaafsma, A.W., Tamburic-Ilinic, L., Miller, J.D. y Hooker, D.C. 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 279-285.
- Schroeder, H.W. y Christensen, J.J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology*, 53: 831-838.
- Shaner, G. y Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67: 1051-1056.
- Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R. y Pirone, T.P. 1992. Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 47-66.
- Smith, H.O. y Wilcox, K.W. 1970. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. *Journal of Molecular Biology*, 51: 379-391.
- Snijders, C.H.A. y Krechting, C.F. 1992. Inhibition of deoxynivalenol translocation and fungal colonization in *Fusarium* head blight resistant wheat. *Canadian Journal of Botany*, 70: 1570-1576.
- Sneath, P. y Sokal, R. 1973. *Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany*, 27: 64-67.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section Martiella. *American Journal of Botany*, 28: 738-742.
- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to Discolor and other sections. *American Journal of Botany*, 32: 657-666.

- Snyder, W.C. y Hansen, H.N. 1954. Variation and speciation in the genus *Fusarium*. Annals of the New York Academy of Sciences, 60: 16-23.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. Tercera Edición. W. H. Freeman and Co., New York, USA.
- Stack, R.W. 1999. Return of an old problem: *Fusarium* head blight of small grains. APSnet feature. APSnet Plant Pathology Online <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/headblight.aspx> (accedido 12 septiembre de 2012).
- Stack, R.W. 2003. History of *Fusarium* head blight with emphasis in North America. Pp. 1-34 en Leonard, K.J. y Bushnell, W.R. (eds.) *Fusarium* Head Blight of wheat and barley. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Stack, R.W. y McMullen, M.P. 1995. A visual scale to estimate severity of *Fusarium* head blight. Ext. Circ. PP-1095. North Dakota State Univ. extension service, Fargo, USA. Disponible en: <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp1095w.htm> (accedido 12 de septiembre de 2012).
- Starkey, D.E., Ward, T.J., Aoki, T., Gale, L.R., Kistler, H.C., Geiser, D.M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. y O'Donnell, K. 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. Fungal genetics and biology, 44: 1191-1204.
- Stenglein, S. y Balatti, P.A. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. Physiological and Molecular Plant Pathology, 68: 158-167.
- Stodart, B.J., Harvey, P.R., Neate, S.M., Melanson, D.L. y Scott, E.S. 2007. Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia. Mycological research, 111: 891-900.
- Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 4: 195-209.
- Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Shephard, G.S. y Nieuwenhuis, J.J. 1991. Production of mycotoxins by selected *Fusarium graminearum* and *F. crookwellense* isolates. Food Additives and Contaminants, 8: 31-41.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as general sources for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research, 17: 6463-6471.
- Tóth, B., Mesterházy, Á., Horváth, Z., Bartók, T., Varga, M. y Varga, J. 2005. Genetic variability of central European isolates of the *Fusarium graminearum* species complex. European Journal of Plant Pathology, 113: 35-45.
- Trail, F. 2009. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. Plant physiology, 149: 103-110.
- Trigo-Stockli, D.M., Sanchez-Mariñez, R.I., Cortez-Rocha, M.O. y Pedersen, J.R. 1998. Comparison of the distribution and occurrence of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in hard red winter wheat for 1993-1996. Cereal Chemistry, 75: 841-846.
- Tu, C. 1930. Physiologic specialization in *Fusarium* spp. causing headblight of small grains. Technical Bulletin. Minnesota Agricultural Experiment Station N°74.

- van der Plank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York, USA.
- van Egmond, H.P., Schothorst, R.C., y Jonker, M.A. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389: 147-157.
- Vesonder, R.F., Ciegler, A. y Jensen, A.H., 1973. Isolation of the emetic factor from *Fusarium*-infected corn. *Applied Microbiology*, 26: 1008-1010.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Walker, S.L., Leath, S., Hagler, W.M.Jr. y Murphy, J.P. 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. *Plant Disease*, 85: 404-410.
- Wang, H., Hwang, S.F., Eudes, F., Chang, K.F., Howard, R.J. y Turnbull, G.D. 2006. Trichothecenes and aggressiveness of *Fusarium graminearum* causing seedling blight and root rot in cereals. *Plant Pathology*, 55: 224-230.
- Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, L. y Tingey, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Wollenweber, K.W. y Reinking, O.A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin, Alemania.
- Xu, Y. y Fang, Z. 1982. Methods of testing the resistance of wheat varieties to the scab and the differentiation of the virulence of the causal organism. *Acta Phytopathologica Sinica*, 12: 53-57.
- Yagen, B. y Joffe, A.Z. 1976. Screening of toxic isolates of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* involved in causing Alimentary Toxic Aleukia. *Applied and Environmental Microbiology*, 32: 423-427.
- Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T.J., Aoki, T., Kistler, H.C. y O'Donnell, K. 2009. A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum* species complex includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East. *Mycologia*, 101: 841-852.
- Yoshizawa, T. y Jin, Y.Z. 1995. Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and barley in Japan. *Food Additives and Contaminants*, 12: 689-694.
- Yoshizawa, T. y Morooka, N. 1973. Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxins from *Fusarium roseum* and moldy barley. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37: 2933-2934.
- Zadoks, J.C, Cheng, T.T. y Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Research*, 14: 415-421.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.